

reference 2

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号
特表2001-525816
(P2001-525816A)

(43) 公表日 平成13年12月11日 (2001. 12. 11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト ⁸ (参考)
A 6 1 K 45/06		A 6 1 K 45/06	
31/454		31/454	
38/00		39/395	D
39/395			N
		A 6 1 P 29/00	1 0 1
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-548911
 (86) (22) 出願日 平成10年5月12日 (1998. 5. 12)
 (85) 翻訳文提出日 平成11年11月12日 (1999. 11. 12)
 (86) 國際出願番号 PCT/GB98/01343
 (87) 國際公開番号 WO98/51344
 (87) 國際公開日 平成10年11月19日 (1998. 11. 19)
 (31) 優先権主張番号 08/854, 881
 (32) 優先日 平成9年5月12日 (1997. 5. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (U.S.)

(71) 出願人 ザ ケネディー インスティチュート オブ リューマトロジー
 英国, ロンドン ダブリュー6 8エルエイチ, ハマースミス, ワン アスペンリー ロード (番地なし)
 (72) 発明者 フェルドマン, マーク
 英国, ロンドン エヌ6 4キューティー, ハイゲート, チャーチ ロード 2
 (72) 発明者 マイニ, ラビンダー, ナス
 英国, ロンドン エスタブリュー13 9イーダブリュー, パーンズ, キャステルノー 151
 (74) 代理人 弁理士 細田 芳徳
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 治療における腫瘍壞死因子アルファおよび血管内皮成長因子の抑制

(57) 【要約】

個体において TNF 媒介疾患を治療および/または予防する方法を開示する。また、TNF α アンタゴニストおよび VEGF アンタゴニストを含有してなる組成物を開示する。TNF 媒介疾患には、リューマチ性関節炎、クローン病、ならびに移植に関連する急性および慢性の免疫疾患が含まれる。

【特許請求の範囲】

1. 治療上の有効量で、個体に対し腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストを同時投与することを含む、その必要がある個体において腫瘍壞死因子媒介疾患を治療または予防する方法。
2. 腫瘍壞死因子媒介疾患が、自己免疫疾患、急性もしくは慢性の免疫疾患、炎症性疾患および神経変性疾患からなる群より選ばれるものである、請求項1記載の方法。
3. さらに、治療上の有効量で個体に対しメトトレキサートを投与することを含む請求項1記載の方法。
4. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、腫瘍壞死因子アルファ合成、腫瘍壞死因子アルファ放出または標的細胞におけるその作用を予防または阻害する、請求項1記載の方法。
5. 腫瘍壞死因子アンタゴニストアルファが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項4記載の方法。
6. 抗体が、キメラ抗体である請求項5記載の方法。
7. 抗体が、キメラcA2抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項6記載の方法。
8. 抗体が、キメラcA2抗体もしくはその抗原結合性断片のヒト腫瘍壞死因子アルファへの結合を競争的に阻害する、抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項6記載の方法。
9. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、腫瘍壞死因子アルファと結合するレセプター分子である、請求項4記載の方法。
10. レセプター分子が、腫瘍壞死因子アルファレセプター／免疫グロブリンG融合タンパク質である、請求項9記載の方法。
11. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、ホスホジエステラーゼ阻害剤である、請求項4記載の方法。
12. ホスホジエステラーゼ阻害剤が、ペントキシフィリンである、請求項11記載の方法。

13. 腫瘍壞死因子アルファが、サリドマイドである、請求項4記載の方法。
14. 血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項1記載の方法。
15. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片であり、かつ血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項1記載の方法。
16. 治療上の有効量で、個体に対し腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストを同時投与することを含む、その必要がある個体においてリュウマチ性関節炎を治療または予防する方法。
17. さらに、治療上の有効量で個体に対しメトトレキサートを投与することを含む請求項16記載の方法。
18. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項16記載の方法。
19. 抗体が、キメラ抗体である請求項18記載の方法。
20. 血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項16記載の方法。
21. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片であり、かつ血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項16記載の方法。
22. 治療上の有効量で、個体に対し腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストを同時投与することを含む、その必要がある個体においてクローン病を治療または予防する方法。
23. さらに、治療上の有効量で個体に対しメトトレキサートを投与することを含む請求項22記載の方法。
24. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体

もしくはその抗原結合性断片である、請求項22記載の方法。

25. 抗体が、キメラ抗体である請求項24記載の方法。

26. 血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項22記載の方法。

27. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片であり、かつ血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項22記載の方法。

28. 治療上の有効量で、個体に対し腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストを同時投与することを含む、その必要がある個体において移植に関連する急性もしくは慢性の免疫疾患を治療または予防する方法。

29. 移植が、腎臓移植、心臓移植、骨髄移植、肝臓移植、膵臓移植、小腸移植、皮膚移植および肺移植からなる群より選ばれるものである、請求項28記載の方法。

30. さらに、治療上の有効量で個体に対しメトトレキサートを投与することを含む請求項29記載の方法。

31. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項29記載の方法。

32. 抗体が、キメラ抗体である請求項31記載の方法。

33. 血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項29記載の方法。

34. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片であり、かつ血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項29記載の方法。

35. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストを含有してなる組成物。

36. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項35記載の組成物。

37. 抗体が、キメラ抗体である請求項36記載の組成物。

38. 血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項35記載の組成物。

39. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片であり、かつ血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項35記載の組成物。

40. さらに、メトレキサートを含有してなる請求項35記載の組成物。

41. 自己免疫疾患、急性もしくは慢性の免疫疾患、炎症性疾患および神経変性疾患等の腫瘍壞死因子媒介疾患を治療または予防するための、請求項35～40のいずれか記載の組成物。

42. リューマチ性関節炎を治療または予防するための、請求項35～40のいずれか記載の組成物。

43. 移植に関連する急性もしくは慢性の免疫疾患を治療または予防するための、請求項35～40のいずれか記載の組成物。

44. 自己免疫疾患、急性もしくは慢性の免疫疾患、炎症性疾患および神経変性疾患等の腫瘍壞死因子媒介疾患を治療または予防するための組成物の製造のための、腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストの使用。

45. リューマチ性関節炎を治療または予防するための組成物の製造のための、腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストの使用。

46. 移植に関連する急性もしくは慢性の免疫疾患を治療または予防するための組成物の製造のための、腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストの使用。

【発明の詳細な説明】

治療における腫瘍壞死因子アルファおよび血管内皮成長因子の抑制

発明の背景

単球とマクロファージは、エンドトキシンその他の刺激に応答して、腫瘍壞死因子アルファ (TNF α)、インターロイキン-1 (IL-1) およびインターロイキン-6 (IL-6) として知られるサイトカインを分泌する。TNF α は 17 kDタンパク質サブユニットの可溶性ホモ三量体である (Smithら, J. Biol. Chem. 262: 6951~6954 (1987))。TNF の膜結合型 26 kD前駆体も存在する (Krieglerら, Cell, 53: 45~53 (1988))。TNF の総説については、Beutlerら, Nature, 320: 584 (1986); Old, Science, 230: 630 (1986); および Leら, Lab. Invest., 56: 234 (1987) を参考のこと。

単球やマクロファージ以外の細胞も TNF α を産生する。例えば、ヒト非単球腫瘍細胞系は TNF α を産生する (Rubinら, J. Exp. Med., 164: 1350 (1986); Spriggsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 6563 (1987))。CD4+およびCD8+末梢血Tリンパ球といくつかの培養TおよびB細胞系 (Cuturiら, J. Exp. Med., 165: 1581 (1987); Sungら, J. Exp. Med., 168: 1539 (1988); Turnerら, Eur. J. Immunol., 17: 1807~1814 (1987)) も TNF α を産生する。

TNF α は、軟骨および骨の崩壊 (Saklatvala, Nature, 322: 547~549 (1986); Bertolini, Nature, 319: 516~518 (1986))、接着分子の誘導や、血管内皮細胞に対する凝血促進活性を誘導したり (Poberら, J. Immunol., 136: 1

680 (1986))、好中球とリンパ球の接着性を増大させたり (Poberら, J. Immunol., 138: 3319 (1987))、マクロファージ、好中球および血管内皮細胞からの血小板活性化因子の放出を刺激する (Cam

ussiら, J. Exp. Med., 166:1390 (1987))など、組織損傷をもたらす前炎症性作用を引き起こす。

TNF α と感染症 (Ceramiら, Immunol. Today, 9:28 (1988))、免疫疾患、腫瘍性の病状 (pathologies) (Offiら, Cell, 50:555 (1987))、自己免疫疾患および移植片対宿主疾患 (Piguetら, J. Exp. Med., 166:1280 (1987))とを結びつける証拠がある。TNF α の癌および感染病との関連性は、しばしば宿主の異化状態に関連する。癌患者は、通常食欲不振を伴う体重減少を起こす。

癌と他の疾患に伴う広範な消耗は、「悪液質」として知られている (Kernら, J. Parent. Enter. Nutr., 12:286~298 (1988))。悪液質には、悪性腫瘍に呼応した漸進的体重減少、食欲不振、細身の体重の持続的侵食が含まれる。悪液質状態は、高い癌罹患率および死亡率の原因になる。TNF α は、癌、感染病および他の異化状態での悪液質に関与するという証拠がある (例えば、BeutlerおよびCerami, Ann. Rev. Immunol., 7:625~655 (1989) を参照されたい)。

TNF α は、発熱、倦怠感、食欲不振および悪液質を含むグラム陰性敗血症と内毒素性ショックを中心的役割を果たすと考えられる (Michieら, Br. J. Surg., 76:670~671 (1989); Debetsら, Second Vienna Shock Forum, 463~466頁 (1989); Simpsonら, Crit. Care Clin., 5:27~47 (1989))。内毒素は、TNF α と他のサイトカイン類の単球/マクロファージ産生および分泌を強く活性化する (Kornbluthら, J. Immunol.

., 137:2585~2591 (1986))。TNF α と他の単球由来サイトカイン類は、内毒素に対する代謝および神経ホルモン反応を媒介する (Michieら, New Engl. J. Med., 318:1481~1486 (1988))。ヒトのボランティアに対する内毒素の投与は、発熱、頻脈、代謝速度の増加とストレスホルモン放出の増加を含むインフルエンザ様の症状を伴う急

性疾患を引き起こす (Revhaugら, Arch. Surg., 123:162~170 (1988))。グラム陰性敗血症にかかった患者では、循環TNF α が増加する (Waageら, Lancet, 1:355~357 (1987); Hammerleら, Second Vienna Shock Forum, 715~718頁 (1989); Debetsら, Crit. Care Med., 17:489~497 (1989); Calandraら, J. Infect. Dis., 161:982~987 (1990))。

このようにTNF α は、炎症性疾患、自己免疫疾患、ウイルス、細菌および寄生虫感染症、悪性腫瘍および／またはニューロジエネレイティブ (neurogenenerative) 疾患と関連づけられており、慢性関節リウマチやクローン病などの疾患において特異的生物学的療法の有用な標的である。TNF α に対するキメラモノクローナル抗体 (cA2) を用いたオープンラベル (open-label) 試験では、慢性関節リウマチ (Elliottら, Arthritis Rheum., 36:1681~1690 (1993); Elliottら, Lancet, 344:1125~1127 (1994)) とクローン病 (Van Dullemenら, Gastroenterology, 109:129~135 (1995)) における炎症の抑制と再発後の再治療の成功と共に、有益な効果が報告されている。cA2を用いた無作為二重盲プラセボ対照試験における有益な結果も、炎症の抑制と共に、慢性関節リウマチで報告されている (Elliottら, Lancet, 344:1105~1110 (1994))。これらの有益な効果は、一部には、炎症性細胞の滑膜への移行量の減少と、IL-1などの炎症誘発性サイトカイン類の放出の抑制によって媒介される (Brennanら, Lancet, 2:244~247 (1989); Feldmannら, Ann. Rev. Immunol., 14:397~440 (1996); Paleologら, Arthritis Rheum., 39:1082~1091 (1996))。

血管透過性因子またはバスキュロトロピン (vasculotropin) としても知られる血管内皮増殖因子 (VEGF) は、拡散性の内皮細胞特異的有糸

分裂促進性血管由来因子であり、これは血管の透過性を増加させることもできる (Ferrara, Breast Cancer Res. Treat., 36(2) : 127~137 (1995))。VEGFは、4つのイソ型からなる約34~45 kDaのジスルフィド結合型ホモ二量体糖タンパク質である（成熟モノマー中に121、165、189または206アミノ酸残基を含む）（例えば Ferrara, Breast Cancer Res. Treat., 36 : 127~137 (1995) ; Dvorakら, Am. J. Path., 146(5) : 1029~1039 (1995) ; Thomas, J. Biol. Chem., 271 : 603~606 (1996) を参照されたい）。 $VEGF_{121}$ と $VEGF_{165}$ の大部分とが可溶型として分泌されるのに対し、 $VEGF_{189}$ と $VEGF_{206}$ は細胞に結合したままである（例えば、Ferrara, Breast Cancer Res. Treat., 36 : 127~137 (1995) ; Dvorakら, Am. J. Path., 146(5) : 1029~1039 (1995) ; Thomas, J. Biol. Chem., 271 : 603~606 (1996) を参照されたい）。

VEGFは、膜貫通型チロシンキナーゼレセプター、fms様チロシンキナーゼレセプター (Flt) (de Vriesら, Science, 255 : 989~991 (1992) ; Shibuyaら, Oncogene, 5 : 519~524 (1990)) およびキナーゼインサートドメイン含有レセプター (kin-

ase insert domain-containing receptor) (KDR) (Termanら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 187 : 1579~1586 (1992)) と相互作用することにより、内皮細胞の増殖を刺激し、微小血管の透過性を増加させる。KDRのネズミホモログは、胎仔肝キナーゼレセプター (Flk) である (Quinnら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 7533~7537 (1993))。（Ferrara, Breast Cancer Res. Treat., 36 : 127~137 (1995) ; Dvorakら, Am. J. Path., 146(5) : 1029~1039 (1995) も参照されたい。）

)。

最近得られた証拠により、VEGFと、血管新生に関する一連の疾患の病因とを関連付けている。例えば、VEGFは、充実性腫瘍、腹水腫瘍、治癒途中の創傷、慢性関節リウマチ、乾癬および糖尿病性網膜症の慢性的血管透過性亢進および血管新生と関連づけられている（例えばBrownら, J. Immunol., 154(6):2801~2807(1995); Dvorakら, Int. Arch. Allergy Immunol., 107:233~235(1995); Ferrara, Breast Cancer Res. Treat., 36(2):127~137(1995); Aielloら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(23):10457~10461(1995); Adamisら, Arch. Ophthalmol., 114:66~71(1996); Kochら, J. Immunol., 152:4149~4156(1994); Peacockら, J. Exp. Med., 175:1135~1138(1992)を参照されたい）。

VEGF発現は、例えば癌、増殖性網膜症、乾癬および慢性関節リウマチ(RA)などの病的状態では上昇すると報告されている（例えばClaffeyら, Cancer Metastasis Rev., 15(2):165~176

(1996); Kochら, J. Immunol., 152:4149~4156(1994)を参照されたい）。例えば血清VEGFレベルはPOEMS（多発性神経障害、臓器巨大症、内分泌障害、Mタンパク質および皮膚変化）症候群を持つ人々では健常者より高いと報告されている（Kondoら, Biophys. Acta, 1221:211~214(1994); Sobrierら, Arth. Rheum., 39:S131(1996); Watanabeら, Lancet, 347:702(1996)）。

VEGFタンパク質とVEGF mRNAはRA患者の滑膜中でマクロファージと管壁細胞に局在化されており、VEGFレセプターはVEGFの標的と推定されるRA滑膜内皮細胞によって発現される（Kochら, J. Immunol., 152:4149~4156(1994); Favaら, J. Exp. Me

d., 180:341~346 (1994)。慢性低酸素症に呼応したVEGF産生量の増加が報告されており (Tudorら, J. Clin. Invest., 95:1798~1807 (1995))、関節内圧が滑膜毛細血管圧を上回る場合、RAでは低酸素状態が優勢である (Blakeら, Lancet, 8633:289~293 (1989))。

RAの動物モデルでは、血管新生の阻害物質が、パンヌス形成を抑制し、血清 VEGF濃度を低下させる共に、疾患の発症を防止し、慢性関節炎を有意に抑制することが見出されている (Oliverら, Cellular Immunol., 157:291~299 (1994); Oliverら, Cellular Immunol., 166:196~206 (1996))。

しかしながら、慢性関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療には改良された方法が望ましい。

発明の要約

本発明は、腫瘍壞死因子 α (TNF α) アンタゴニストと血管内皮増殖因子 (VEGF) アンタゴニストをその個体に治療有効量または相乗作用量で同時投与するステップを含む、治療または予防の必要を有する個体の腫瘍壞死因子媒介性疾患を治療および／または予防する方法を提供する。また本発明は、TNF α アンタゴニストとVEGFアンタゴニストとをその個体に治療有効量で同時投与するステップを含む、治療または予防の必要を有する個体のTNF媒介性疾患の再発を治療および／または予防する方法をも提供する。TNF媒介性疾患としては、リューマチ性関節炎、クローン病、同種移植（例えば腎臓、心臓、骨髄、肝臓、脾臓、小腸、皮膚または肺移植）に伴う急性および慢性免疫疾患が挙げられる。

一態様として、本発明は、TNF α アンタゴニストとVEGFアンタゴニストとを個体に治療有効量で同時投与するステップを含む、個体のリューマチ性関節炎を治療または予防（例えばその再発を予防）する方法に関する。第二の態様として、本発明は、TNF α アンタゴニストとVEGFアンタゴニストとを個体に治療有効量で同時投与するステップを含む、個体のクローン病を治療および

／または予防（その再発を予防など）する方法に関する。第三の態様として、本発明は、TNF α アンタゴニストとVEGFアンタゴニストとをその個体に治療有効量で同時投与するステップを含む、個体において移植に伴う急性または慢性免疫疾患を治療および／または予防する方法に関する。

TNF α アンタゴニストとVEGFアンタゴニストとの治療的同時投与に組み合わせて、他の治療養生および他の治療薬を使用できる。例えば、具体的な態様として、メトレキサートがTNF α アンタゴニストおよびVEGFアンタゴニストと共に治療有効量または相乗作用量で同時投与される。

さらに、本発明は、例えば、治療用の、または前記疾患治療用薬剤を製造するための、TNF α アンタゴニストとVEGFアンタゴニストとを含有した組成物に関する。具体的な態様として、本組成物は、さらにメトレキサートを含有する。

本発明で有用なTNF α アンタゴニストとしては、抗TNF α 抗体とその抗原結合性断片；TNF α に特異的に結合するレセプター分子；TNF α 合成、TNF α 放出または標的細胞に対するその作用を阻止および／または抑制する化合物、例えばサリドマイド、テニダップ（tenidap）、ホスホジエステラーゼ阻害剤（例；ペントキシフィリン、ロリプラム）、A2bアデノシンレセプター α ゴニストおよびA2bアデノシンレセプターエンハンサーなど；TNF α レセプターシグナル伝達を阻止および／または抑制する化合物、例えばマイトジエン活性化プロテイン（MAP）キナーゼ阻害剤など；膜TNF α 切断をブロックおよび／または抑制する化合物、例えばメタロプロテイナーゼ阻害剤など；TNF α 活性をブロックおよび／または抑制する化合物、例えばアンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害剤（例；カプトプリル）；TNF α の産生および／または合成をブロックおよび／または抑制する化合物、例えばMAPキナーゼ阻害剤などが含まれる。

本発明で有用なVEGFアンタゴニストとしては、抗VEGF抗体とその抗原結合性断片；VEGFに特異的に結合するレセプター分子；VEGF機能を阻止および／または抑制する化合物（例えばスラミン、プロテインチロシンキナーゼ

(P T K) 阻害剤（例えば、ラベンズスチンA（l a v e n d u s t i n A））；V E G F レセプターまたはその細胞外ドメインへのV E G F の結合を阻止および／または抑制する化合物（例えば血小板因子4（P F - 4））；V E G F レセプターシグナル伝達をブロックおよび／または妨害する化合物；V E G F 活性化をブロックおよび／または妨害する化合物（例えばミトラマイシン）が挙げられる。本発明で有用なV E G F アンタゴニストとしては、V E G F の產生および／または合成を駆動するシグナルのアンタゴニストである物質、例えばT G F β またはそのリガンドを減少および／またはブロックする物質が挙げられる。

図面の簡単な説明

本発明の上記およびその他の目的、特徴および利点は、同じ参照符号はどの図面でも同じ部分を指す添付の図面に示すように、下記の本発明の好ましい態様のより具体的な説明から明らかになるだろう。図面は必ずしも一定の縮尺で描かれているわけではなく、本発明の原理を説明することに重点が置かれている。

図1は、T N F α またはI L - 1 α の非存在下または存在下での刺激後に単球細胞、内皮細胞およびR A 線維芽細胞によって分泌される、E L I S Aで決定したV E G F 濃度を示すグラフである。各値は、3回の測定の平均±S Dであり、3回の同様の実験の代表例である。

図2 Aは、年齢と性別が合致した非関節炎患者とR A 患者における、E L I S Aで決定した血清V E G F 濃度を示すグラフである。

図2 Bは、血清V E G F 濃度とC反応性タンパク質レベルとの間の相関度を示すグラフである。

図3は、プラセボ、1 m g／k g 抗T N F α 抗体c A 2 または1 0 m g／k g 抗T N F α 抗体c A 2 の点滴後のR A 患者における、E L I S Aで決定した血清V E G F レベルを示すグラフである。

図4 Aは、3 m g／k g の抗T N F α 抗体c A 2 （第0、2、6、10 および14週に点滴）、メトトレキサート（7. 5 m g／週）またはc A 2 とメトトレキサートの組み合わせによる治療後のR A 患者における血清V E G F レベルを示すグラフである。

図4Bは、メトレキサート(7.5mg/週)のみ、もしくは1mg/kg、3mg/kgまたは10mg/kgの抗TNF α 抗体cA2(第0、2、6、10および14週に点滴)とメトレキサート(7.5mg/週)との併用による治療後のRA患者における血清VEGFレベルを示すグラフである。

発明の詳細な説明

本明細書に記載された研究は、VEGFの産生がTNF α やIL-1などの前

炎症サイトカインによって誘導されうることと、生体内でのTNF α 活性のブロックがVEGFの循環濃度を低下させることを示す。血管新生に関連する疾患では、循環中に存在する過剰のVEGFが患部組織で産生されるようである。VEGFは強力で特異的な血管新生の誘導物質なので、循環VEGFの低下は血管新生を起こす傾向の低下を反映する。したがってTNF α の長期にわたるブロックは患部組織における新生血管形成を、それゆえ細胞質量を減少させうる。

リューマチ性関節炎病変の顕著な特徴は、顕著な新しい造血(new blood formation)に関連し、それゆえ栄養素と細胞の移入を永続させる侵襲性パンヌスと共に、血液からの炎症細胞の浸潤、および最終的には骨と軟骨の破壊につながる炎症反応である。VEGFは、血管新生の強力な誘導物質であり、RAにおける血管の形成と微小血管内皮の活性化に関連づけられていた。

本明細書に記載されたデータは、VEGF血清濃度が進行中のRA患者では健常者でのVEGF血清濃度と比較して有意に上昇し、またそれが、RAにおける炎症と疾患活動度のマーカーであるC反応性タンパク質(CRP)と相関することを示す。CRPの産生は、前炎症サイトカイン類によって調節され、その総産生量は疾患の進行速度とよく相関する。さらに、疾患症状の軽減につながる抗TNF α モノクローナル抗体によるRA患者の処置は、血清VEGF濃度の有意で持続的な低下をもたらす。抗TNF α モノクローナル抗体とメトレキサートとの併用によるRA患者の処置は、抗TNF α 抗体のみまたはメトレキサートのみで処置された患者と比較して、より持続的な血清VEGFレベルの低下をもたらす。血清VEGFは、VEGFの合成を反映するであろうため、生体内でのVEGF産生はサイトカイン依存的であることが示唆される。

VEGFは、増加した血管透過性の誘導と血管液の周辺組織への漏出をもたらす。リウマチ様関節では、血管外液の存在が詳細に実証されており、臨床的には関節滲出液として明らかである。さらにまた、抗TNF α 抗体によるRA患者の治療が、MRI撮像法によって決定される関節液含量の減少をもたらすことも確認されている(Kalden-Nemethら, Rheumatol. Int., 16:219(1997))。これは、VEGFが、抗TNF α による処置後に迅速に減少するRAでの関節の腫脹にもある役割を果たすことを示唆している。

また本データは、RAにおける血清VEGF濃度上昇の一因であるとの仮説を立て得る単球細胞、内皮細胞および滑膜線維芽細胞が、VEGFを構成的に分泌することと、RA滑膜細胞による自発的なVEGFの放出が、サイトカイン活性の阻害物質、すなわち抗TNF α 抗体とIL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1ra)の存在下で著しく減少することを示す。IL-1raと抗TNF α 抗体による滑膜細胞からのVEGF分泌の減少は、インビボでの血清VEGF産生が炎症誘発性サイトカインによって調節されることの証拠となる。

コラゲナーゼ/DNAーゼ消化によるRA滑膜細胞の単離は、主として単核細胞とそれより少ない程度の線維芽細胞とからなる不均質な細胞集団を与える(Brennanら, Lancet, 2:244~247(1989); Buchanら, Clin. Exp. Immunol., 73:449~455(1988))。これらの細胞を長期間(最長9日間)培養すると、接着性線維芽細胞様細胞の出現を伴って、CD14+、CD45+およびCD3+細胞数の減少が起こる。最も早いVEGFの細胞培養上清への検出可能な放出は、24時間時点で観察された。しかしながら、RA滑膜細胞の培養上清中のTNF α レベルが迅速(播種後2時間以内)に増加した後、培養5~6日までに検出不可能なレベルに戻るのとは対照的に、培養中のVEGFレベルは単離の9日後でさえ増加しつづけた(Buchanら, Clin. Exp. Immunol., 73:449~455(1988))。マクロファージ様細胞は、RA滑膜外植片培養におけるTNF α の主な供給源であるが、VEGFは、単球細胞と線維芽細胞の両方によつ

て放出される。これは、THP-1細胞と滑膜線維芽細胞を用いた本明細書に記載のデータと一致する。

VEGF分泌に関して、TNF α とIL-1に対するRA滑膜線維芽細胞、内皮細胞および単球細胞の弁別的なインビトロ感受性は、血清VEGFの減少が、抗TNF α 抗体によるTNF α 活性のインビボブロックと、TNF α ブロックの結果起こるIL-1活性のインビボブロックに続いて、単球/マクロファージと微小血管内皮細胞によるVEGF産生量が減少する結果であることを示唆している。滑膜外植片培養は、マクロファージ様細胞（これはTNF α に応答してVEGFを放出する）と線維芽細胞（この細胞からの分泌は、IL-1のみによって誘導される）の両方からなる。これらの細胞は、細胞上清へのVEGF放出に様々な度合いの貢献をする。このように、RA患者におけるVEGF産生の最適な阻害には、TNF α 活性とIL-1活性の両方のブロックが必要でありうる。

滑膜線維芽細胞はTNF α に応答して有意な量のVEGFを分泌しえなかつたものの、IL-1がこれらの細胞にとって強力な刺激物質であることが見出されたし、かつ抗TNF α 抗体処理はTNF α の下流のサイトカイン類のカスケードを不活性化するので、線維芽細胞によるVEGFの放出へのさらなる間接的影響がありうる（Brennanら, Lancet, 2:244~247 (1989)）。抗TNF α 抗体による血清VEGF濃度の不完全な減少は、きっと、VEGF産生のサイトカイン非依存性成分、例えは、低酸素症によるものなどのインビボの存在によるものであろう（Blakeら, Lancet, 8633:289~293 (1989)；およびおTuderら, J. Clin. Invest., 95:1798~1807 (1995)）。さらにまた、単球細胞、内皮細胞および線維芽細胞は、外からの刺激がなくても有意な量のVEGFを放出する。

これらの結果は、TNF α とIL-1とを含む前炎症性サイトカイン類が試験管内と生体内でVEGF産生の調節に関与することを明らかに示している。とりわけ、抗TNF α 抗体処置後の血清濃度の減少から判断されるように、TNF α は生体内でVEGF産生を調節することから、抗TNF α 抗体治療法の利益の一

部が血管新生の減少によるものでありうることと、長期間にわたる TNF α ブロックが新生血管形成を、したがってパンヌスの細胞量とその破壊能力とを減少させうることが示唆される。

したがって、VEGF と血管形成経路の他の成分とは、RAにおいて、抗TNF α 療法による相乗作用を樹立するのに適した標的である。したがって、本発明は、TNF α アンタゴニストと VEGF アンタゴニストとを個体に治療有効量または相乗作用量で同時投与するステップを含む、個体の TNF 媒介性疾患を治療および／または予防する方法を包含する。さらに本発明は、ある個体の TNF 媒介性疾患の再発を治療および／または予防する方法であって、TNF α アンタゴニストと VEGF アンタゴニストとをその個体に治療有効量で同時投与することを含んでなる方法に関する。TNF α アンタゴニストと VEGF アンタゴニストとは、同時にまたは逐次的に投与できる。TNF α アンタゴニストと VEGF アンタゴニストとは、それぞれ単回で、または複数回に分割して投与できる。複数の VEGF アンタゴニストと複数の TNF アンタゴニストとを同時投与できる。他の治療養生と治療薬とを TNF α アンタゴニストと VEGF アンタゴニストとの治療的同時投与に組み合わせて使用できる。例えば、具体的な態様として、メトトレキサートを治療有効量または相乗作用量で、TNF α アンタゴニストおよび VEGF アンタゴニストと同時投与する。

本明細書でいう「TNF 媒介性疾患」とは、TNF 関連病または疾患を指す。TNF 関連病または疾患として、限定されないが、下記のものが挙げられる：

(A) 炎症性疾患、限定されないが、急性および慢性免疫ならびに自己免疫疾患など、限定されないが、リューマチ性関節炎 (RA)、若年性慢性関節炎 (JCA)、脊椎関節症、甲状腺炎、移植片対宿主疾患 (GVHD)、強皮症、糖尿病、グレーブス病、アレルギーなど；例えば限定されないが、腎移植、心臓移植、骨髄移植、肝臓移植、脾臓移植、小腸移植、肺移植および皮膚移植などの同種移植に伴う急性または慢性免疫疾患；限定されないが、サルコイドーシス、慢性

炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、クローン病または疾患などの慢性炎症病；血管炎症病、例えば播種性血管内凝固、アテローム性動脈硬化、川崎病、例えば限定さ

れないが、結節性多発性動脈炎、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホーシーンライン紫斑病、巨細胞性動脈炎、腎臓の微視的脈管炎などの脈管炎症候群；慢性活動性肝炎：シェーグレン症候群；脊椎関節症、例えは限定されないが、強直性脊椎炎、乾癬性関節炎と脊椎炎、腸性関節炎と脊椎炎、活動性関節炎と炎症性腸疾患に伴う関節炎など；ならびにブドウ膜炎など；

(B) 感染症、限定されないが、例えは、急性または慢性細菌感染による敗血症症候群、悪液質、循環虚脱およびショック、急性および慢性寄生虫性疾患および／またはヒト免疫不全ウイルス（HIV）などの細菌、ウイルスまたは菌類性の感染性疾患、（悪液質、自己免疫障害、AIDS痴呆症候群および感染症の症状を含む）後天性免疫不全症候群（AIDS）など；

(C) 神経変性疾患、例えは多発性硬化症や急性横断性脊髄炎など（ただしこれらに限らない）の脱髓疾患；重症筋無力症；皮質脊髄系の損傷などの錐体外路系および小脳性疾患；大脳基底核の障害または小脳障害；ハンチントン舞蹈病や老年性舞蹈病などの多動性運動障害；薬物誘発性運動障害、例えは中枢神経系（CNS）ドーパミンレセプターをブロックする薬物によって誘導されるものなど；パーキンソン病などの減動性運動障害；進行性核上麻痺；小脳および脊髄小脳性障害、例えは小脳の非構造的（structural）病変など；脊髄小脳変性症（脊髄性運動失調、フリードライヒ失調症、小脳皮質変性、多系統変性（マンセル、デジエリーヌートマス、シードレーガー、マシャドヨセフ）；全身性障害（レフサム病、無β-リポ蛋白血症、運動失調、毛細血管拡張症、ミトコンドリアマルチシステム障害）；運動単位の障害、例えは神経原性筋萎縮症（筋萎縮性側索硬化症、乳児脊髄筋萎縮、若年性脊髄性筋萎縮症などの前角細胞変性）など；アルツハイマー病；中年のダウント症候群；広汎性レビ小体疾患；レビ小体型の老人性痴呆症；ウェルニッケ・コルサコフ症候群；慢性アルコール中毒症

；原発性胆汁性肝硬変；特発性線維性肺胞炎と他の線維性肺疾患；溶血性貧血；クロイツフェルト・ヤコブ病；亜急性硬化性全脳炎、ハレルフォルデン・スパツ病；ボクサー痴呆など、またはそれらの任意のサブセット；

(D) 悪性疾患、例えはTNF α 分泌性腫瘍またはTNF α が関与する他の悪

性腫瘍など、例えば白血病（急性、慢性骨髓性、慢性リンパ球性および／または骨髓異形成症候群）；リンパ腫（ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、例えば悪性リンパ腫（バーキットリンパ腫または菌状息肉症）など）；

（E）過剰な TNF α が関与する悪液質症候群とその他の病状および疾患、例えば、限定されないが、癌、寄生虫性疾患および心不全の悪液質；

（F）アルコール性肝炎と他の型の慢性肝炎；

（G）血管新生または VEGF／VPF 産生が役割を果たす疾患、例えば、限定されないが、眼新生血管形成、乾癬、十二指腸潰瘍、女性生殖路の血管新生、慢性関節炎、例えば変形性関節症絨毛結節性滑膜炎や血友病性関節炎などの出血性疾患に伴う慢性関節炎など。

例えば、参考文献として本明細書に取り込まれる、Berkowら編、The Merck Manual, 第16版, 第11章, 1380～1529頁 (Merck and Co. 社, ニュージャージー州ローウェイ, 1992) を参照されたい。

「再発（recurrence）」「再燃」または「再発（relapse）」という用語は、その疾患状態の1以上の症状の再顕現を包含するものとする。例えばリューマチ性関節炎の場合、再発としては、腫れ上がった関節、朝のこわばりまたは関節圧痛の1以上の経験を挙げることができる。

一態様として、本発明は、TNF α アンタゴニストと VEGF アンタゴニストをその個体に治療有効量または相乗作用量で同時投与するステップを含む、個体のリューマチ性関節炎を治療および／または予防する方法に関する。

第二の態様として、本発明は、TNF α アンタゴニストと VEGF アンタゴニストをその個体に治療有効量または相乗作用量で同時投与するステップを含む、個体のクローン病を治療および／または予防する方法に関する。

第三の態様として、本発明は、TNF α アンタゴニストと VEGF アンタゴニストをその個体に治療有効量または相乗作用量で同時投与するステップを含む、個体における同種移植に伴う急性または慢性免疫疾患を治療および／または予防する方法に関する。本明細書で用いられる「移植」としては、腎臓移植、心臓移

植、骨髄移植、肝臓移植、脾臓移植、小腸移植、皮膚移植、肺移植などの器官、組織または細胞移植が含まれる。

具体的な態様として、本発明の方法はさらに、メトレキサートをその個体に治療有効量または相乗作用量で投与するステップを含む。

TNF α アンタゴニストとVEGFアンタゴニストによる併用療法の利益は、それぞれのアンタゴニスト単独による治療で得られるものと比較して有意に改善された応答である。TNF α アンタゴニストと、メトレキサートと、VEGFアンタゴニストとによる併用療法も、それぞれの薬物単独での治療で得られるものと比較して有意に改善された応答を与える。例えば、VEGFアンタゴニストは、相乗効果が達成するように、TNF α アンタゴニストまたはTNF α アンタゴニストとをメトレキサートとを組み合わせて投与できる。また、同じ治療応答を得るのに、より低い投与量を使用することができるので、治療効果と毒性効果の間の治療ウインドウが広がる。また、より低い投与量は、患者にとってより低い経済的費用をもたらすことにもなり、副作用が減る可能性もある。さらにメトレキサートは抗TNF α 抗体の免疫原性を低下させることにより、安全性の増した抗TNF α 抗体の投与を可能にする。

また、本発明は、TNF α アンタゴニストとVEGFアンタゴニストとを含有した組成物に関する。具体的な態様として、本組成物は、さらにメトレキサートを含有する。本発明の組成物は、TNF α アンタゴニストと反応する物質の異常なレベル、とりわけ正常で健康な対象中に存在する過剰レベルのTNF α と関係

する病状または状態の対象の処置に有用であり、ここでかかる過剰レベルまたは減少したレベルは、局所もしくは特定の、全身の組織タイプまたは身体の位置で起こる。かかる組織タイプとしては、限定されないが、例えば、血液、リンパ、中枢神経系(CNS)、肝臓、腎臓、脾臓、心筋または血管、脳または脊髄白質または灰白質、軟骨、靭帯、腱、肺、脾臓、卵巣、精巣、前立腺が含まれ得る。正常レベルに対する増加したTNF α 濃度は、関節、神経血管接合部、骨、特定の鍵もしくは靭帯などといった身体の特定の領域または細胞、または細菌もしくはウイルス感染などの感染部位にも局在しうる。本発明の組成物は前記疾患を治

療するための薬剤の製造にも使用できる。

腫瘍壞死因子 α アンタゴニスト

本明細書で用いられる「腫瘍壞死因子 α アンタゴニスト」は、インビボでTNF α 活性を減少、ブロック、抑制、抑止または妨害する。例えば好適なTNF α アンタゴニストはTNF α を結合でき、抗TNF α 抗体、その抗原結合性断片およびTNF α に特異的に結合するレセプター分子と誘導体が含まれる。好適なTNF α アンタゴニストは、TNF α 合成および／またはTNF α 放出を阻止または抑制することもでき、サリドマイド、テニダップ（tenidap）、ホスホジエステラーゼ阻害剤、例えば、限定されないが、ペントキシフィリンやロリブランなどの化合物が含まれる。TNF α 合成および／またはTNF α 放出を阻止または抑制できる好適なTNF α アンタゴニストには、A2bアデノシンレセプターエンハンサーとA2bアデノシンレセプターアゴニスト（例えば5'-(N-シクロプロピル)カルボキシアミドアデノシン、5'-(N-エチルカルボキシアミドアデノシン、シクロヘキシリルアデノシン、R-N⁶-フェニル-2-プロピルアデノシン）も含まれる。例えば、その教示はすべて参考文献として本明細書に取り込まれるJacobson, GB2289218Aを参照されたい。好適なTNF α アンタゴニストは、TNF α レセプターシグナル伝達を阻止または

抑制することもでき、マイトジエン活性化プロテイン(MAP)キナーゼ阻害剤が含まれる（例えばSB203580；LeeおよびYoung, J. Leukocyte Biol., 59:152~157(1996)であり、その教示はすべて参考文献として本明細書に取り込まれる）。他の好適なTNF α アンタゴニストには、膜TNF α 切断を減少、ブロック、抑制、抑止または妨害する物質、例えば、限定されないが、メタロプロテイナーゼ阻害剤；TNF α 活性を減少、ブロック、抑制、抑止または妨害する物質、例えば、限定されないが、カプトプリル、エナラプリル、リシノプリルなどのアンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤；TNF α 産生および／または合成を減少、ブロック、抑制、抑止または妨害する物質、例えば、限定されないが、MAPキナーゼ阻害剤がある。TNF α アンタゴニストは米国特許出願第08/690,775号明細書(199

6年8月1日出願)、米国特許出願第08/607, 419号明細書(1996年2月28日出願)、国際公開第95/09652号パンフレット(1995年4月13日公開)、米国特許出願第08/403, 785号明細書(1993年10月6日出願)、国際公開第94/08619号パンフレット(1994年4月28日公開)、米国特許出願第07/958, 248号明細書(1992年10月8日出願)にも記述されている。これらの参考文献はすべてそのまま参照により本明細書に組み込まれる。

抗TNF α 抗体

本明細書で用いられる抗腫瘍壞死因子 α 抗体は、インビボでのTNF α 活性を減少、ブロック、抑制、抑止または妨害する。好ましい一態様として、本抗体は、抗原を特異的に結合する。本抗体は、ポリクローナルでもモノクローナルでもよく、抗体という用語はポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方を含するものとする。ポリクローナルおよびモノクローナルという用語は、抗体調製物の均一性の程度をいい、特定の生産方法に限定されないものとする。

好適な抗体は、入手可能であるか、適当な免疫原、例えば単離および/または組換え抗体あるいはその一部(合成ペプチドなどの合成功子を含む)に対して、または組換え抗原を発現させる宿主細胞に対して生じさせることができる。また、組換え抗原を発現させる細胞、トランスフェクト細胞などは免疫原として、またはレセプターを結合する抗体の選別に使用できる(例えばChunthara paiala, J. Immunol., 152:1783~1789(1994); およびChunthara paiala, 米国特許第5, 440, 021号を参照されたい)。

免疫抗原の調製とポリクローナルおよびモノクローナル抗体生産は、任意の適当な技術を使って行いうる。様々な方法が記述されている(例えばKohlerら, Nature, 256:495~497(1975)およびEur. J. Immunol., 6:511~519(1976); Milsteinら, Nature, 266:550~552(1977); Koprowskiら, 米国特許第4, 172, 124号; Harlow, E. およびLane, D. 198

8, Antibodies: A Laboratory Manual (コールドスプリングハーバーラボラトリー、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州) ; Current Protocols In Molecular Biology, Vol. 2 (Supplement 27, '94年夏) 、Ausubelら編 (John Wiley & Sons社、ニューヨーク州ニューヨーク) 第11章 (1991) を参照されたい)。一般に、ハイブリドーマは適当な不死細胞株 (例えばSP2/0などの骨髄腫細胞株) を抗体産生細胞と融合することによって生産できる。抗体産生細胞、好ましくは脾臓またはリンパ節のものは、目的の抗原で免疫した動物から得ることができる。融合細胞 (ハイブリドーマ) は、選択培養条件を使って単離し、限界希釈法でクローン化できる。所望の特異性を持つ抗体を産生する細胞は、適当なアッセイ (例えばELISA) で選択できる。

例えば組換え抗体またはその一部をライブラリーから選択する方法、例えばファージディスプレイ法による方法 (例えばWintersら, Ann. Rev. Immunol., 12:433~455 (1994); Hoogenboomら, 国際公開第93/06213号パンフレット; Hoogenboomら, 米国特許第5, 565, 332号明細書; 国際公開第94/13804パンフレット (1994年6月23日公開); Krebbelら, 米国特許第5, 514, 548号明細書; Dowerら, 米国特許第5, 427, 908号明細書を参照されたい) や、ヒト抗体の全レパートリーを産生できるトランスジェニック動物 (例えばマウス) の免疫化による方法 (例えばJakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551~2555 (1993); Jakobovitsら, Nature, 362:255~258 (1993); Kucherlapatiら, 欧州特許第EP0463151B1号明細書; Lonbergら, 米国特許第5, 569, 825号明細書; Lonbergら, 米国特許第5, 545, 807号明細書を参照されたい) などが挙げられ、必要な特異性を持つ抗体 (ヒト抗体を含む) を生産または単離する他の適当な方法を使用できる

。

単鎖抗体およびキメラ、ヒト化または靈長類化（フレームワーク変更を伴うまたは伴わないCDR移植抗体）もしくはベニヤード（veneered）抗体、ならびに異なる種に由来する部分を含有するキメラ、CDR移植またはベニヤード単鎖抗体なども、本発明および用語「抗体」に包含される。これらの抗体の様々な部分は従来の技術により互いに化学的に結合することができ、または遺伝子工学的技術を使って連続したタンパク質として製造することができる。例えば、連続したタンパク質を製造するために、キメラ鎖またはヒト化鎖をコードする核酸を発現させることができる。例えばCabillyら、米国特許第4,816,567号；Cabillyら、欧州特許番号0,125,023B1；Bossら、米国特許第4,816,397号；Bossら、欧州特許番号0,120,694B1；Neuberger, M. S. ら、WO86/01533；Neuberger, M. S. ら、欧州特許番号0,194,276B1；Winter, 米国特許第5,225,539号；Winter, 欧州特許番号0,239,400B1；Queenら、米国特許第5,585,089号；Queenら、欧州特許番号0,451,216B1；Adairら、WO91/09967、1991年7月11日公開；Adairら、欧州特許番号0,460,167B1；Padlan, E. A. ら、欧州特許番号0,519,596A1を参照のこと。また、靈長類化抗体については、Newman, R. ら、Biotechnology, 10:1455~1460 (1992) を、単鎖抗体については、Hustonら、米国特許第5,091,513号；Hustonら、米国特許第5,132,405号；Ladnerら、米国特許第4,946,778号およびBird, R. E. ら、Science, 242:423~426 (1988) を参照のこと。

また、キメラ、ヒト化、靈長類化、ベニヤードまたは単鎖抗体などの断片を含む、抗体の抗原結合性断片も製造できる。例えば抗原結合性断片には、Fv、Fab、Fab' およびF(ab')₂断片などの断片が含まれるが、これらに限らない。抗原結合性断片は例えば酵素による切斷や組換え技術によって製造でき

る。例えばパパインまたはペプシンによる切断はそれぞれF_ab断片またはF_(ab')₂断片を生成しうる。抗体は、1以上のストップコドンが本来の終止部位の上流に導入されている抗体遺伝子を用いて、様々な短縮型としても製造できる。例えばF_(ab')₂重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、重鎖のCH₁ドメインとヒンジ領域をコードするDNA配列を含むように設計できる。

本発明で有用な抗-TNF_α抗体は、TNF_αへの高親和性結合と低い毒性（ヒト抗-ネズミ抗体（HAMA）および／またはヒト抗-キメラ抗体（HACA）応答を含む）を特徴とする。とりわけ、可変領域、定常領域およびフレームワ

ークなどの個々の成分が個別におよび／または全体として低い免疫原性を持つ抗体は、本発明で有用である。本発明で使用できる抗体は、長期間にわたる患者の治療に使用でき、その間、良好ないし優れた症状の軽減と低い毒性を示すそれらの能力を特徴とする。低い免疫原性および／または高い親和性とその他の不確定な特性が、達成される治療結果に貢献しうる。「低い免疫原性」とは、本明細書では、治療された患者の約75%未満、好ましくは約50%未満で有意なHACAまたはHAMA応答を引き起こすこと、および／または、治療された患者で低い力値（二重抗原酵素免疫アッセイで測定して約300未満、好ましくは約100未満）を生じさせることと定義される（Elliott, Lancet, 344:1125~1127 (1994)；これは文献として本明細書において援用される）。

具体的な態様として、その抗-TNF_α抗体は、キメラモノクローナル抗体cA2（もしくはその抗原結合性断片）またはネズミモノクローナル抗体A2（もしくはその抗原結合性断片）であるか、キメラ抗体cA2、ネズミモノクローナル抗体A2もしくはそれらの抗原結合性断片、それらは、キメラ抗体cA2またはネズミモノクローナル抗体A2もしくはそれらの抗原結合性断片によって結合されるものと同じまたは機能的に等価なヒトTNF_α上のエピトープと反応する抗体もしくは抗原結合性断片を含んでおり、それらのものと類似するエピトープ特異性を有する。キメラ抗体cA2またはネズミモノクローナル抗体A2のものと類似するエピトープ特異性を持つ抗体には、ヒトTNF_αへの結合に関してキメ

ラ抗体c A 2 またはネズミモノクローナル抗体A 2（もしくはそれらの抗原結合性断片）と競争できる抗体が含まれる。かかる抗体もしくは断片は、上述のように得ることができる。キメラ抗体c A 2、ネズミモノクローナル抗体A 2およびこれらの抗体を得る方法は、米国特許出願第08/192,093号（1994年2月4日出願）、米国特許出願第08/192,102号（1994年2月4日出願）、米国特許出願第08/192,861号（1994年2月4日出願）

、米国特許出願第08/324,799号（1994年10月18日出願）、Le, J. ら、国際公開番号WO92/16553（1992年10月1日公開）、Knight, D. M. ら、Mol. Immunol., 30:1443~1453（1993）、およびSiegel, S. A. ら、Cytokine, 7(1):15~25（1995）にも記載されている。これらの文献はそれぞれ参照により本明細書において全て援用される）。

キメラ抗体c A 2 は、A 2 と名づけられた高親和性中和マウス抗ヒトTNF α IgG1抗体の抗原結合性可変領域と、ヒトIgG1、カッパ免疫グロブリンの定常領域とからなる。ヒトIgG1Fc領域は、同種抗体エフェクター機能を改善し、循環血清半減期を増加させ、抗体の免疫原性を減少させる。キメラ抗体c A 2 の結合力とエピトープ特異性はネズミ抗体A 2 の可変領域に由来する。特定の態様として、ネズミ抗体A 2 の可変領域をコードする核酸の好ましい供給源はA 2 ハイブリドーマ細胞株である。

キメラA 2 (c A 2) は、天然ヒトTNF α と組換えヒトTNF α のどちらの細胞傷害作用も用量依存的に中和する。キメラ抗体c A 2 と組換えヒトTNF α の結合アッセイから、キメラ抗体c A 2 の親和定数は $1.04 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ と計算された。モノクローナル抗体の特異性と親和力を競争的阻害によって決定する好ましい方法は、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 1988; Colliganら編, Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and

Wiley Interscience社, ニューヨーク(1992, 1993) ; Kozborら, Immunol. Today, 4:72~79(1983) ; Ausubelら編, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience社, ニューヨーク(1987, 1992, 1993) ; および Muller, Meth. Enzymol., 92:589~601(1983) に見出すことができる。これらの文献は参考により本明細書において全て援用される。

具体的な様として、ネズミモノクローナル抗体A2は、c134Aと名づけられた細胞系によって生産される。キメラ抗体cA2は、c168Aと名づけられた細胞系によって生産される。

抗-TNF α 抗体（もしくはその抗原結合性断片）のさらなる例は、当技術分野に記載がある（例えば、米国特許第5, 231, 024号；Miller, A. ら, Cytokine, 2(3) : 162~169(1990) ; 米国特許出願第07/943, 852号（1992年9月11日出願）；Rathjenら, 国際公開番号WO91/02078（1991年2月21日公開）；Rubinら, EPO特許公開第0218868号（1987年4月22日公開）；Yoneら, EPO特許公開第0288088号（1988年10月26日）；Langら, Biochem. Biophys. Res. Comm., 137:847~854(1986) ; Meagerら, Hybridoma, 6:305~311(1987) ; Fendlyら, Hybridoma, 6:359~369(1987) ; Bringmanら, Hybridoma, 6:489~507(1987) ; およびHiraiら, J. Immunol. Meth., 96:57~62(1987) を参照のこと。これらの文献は参考により本明細書において全て援用される）。

本明細書で使用する、用語「抗原結合領域」とは、抗体分子のうち、抗原と相互作用するアミノ酸残基を含み、その抗体に抗原に対する特異性と親和性とを付与する部分を指す。抗原結合領域には、抗原結合残基の適切なコンフォメーションを維持するのに必要な「フレームワーク」アミノ酸残基が含まれる。

抗原という用語は、抗体によって結合されうる分子または分子の一部であって、その抗原のエピトープに選択的に結合できる抗体を動物に産生させることもで

きるものを指す。抗原は1以上のエピトープを持ちうる。

エピトープという用語は、抗原のうち、抗体によって認識され、抗体によって、その抗体の抗原結合領域の1以上で結合されうる部分を指すものとする。通常、エピトープは、アミノ酸や糖側鎖などといった分子の化学的に活性な表面配置からなり、特定の三次元構造上の特徴と、特定の電荷特徴とを持つ。「阻害および／または中和エピトープ」とは、抗体によって結合されたときに、インビボまたはインビトロで、より好ましくはインビボで、そのエピトープを含有する分子の生物学的活性、例えば、TNF α のTNF α レセプターへの結合などの喪失をもたらすエピトープを意味する。

TNF α レセプター分子

本発明の方法と組成物に有用なTNF α レセプター分子は、高い親和性でTNF α を結合し（例えばFeldmannら、国際公開番号WO92/07076（1992年4月30日公開）；Schallら、Cell, 61:361~370（1990）；およびLoetscherら、Cell, 61:351~359（1990）を参照のこと。これらの文献は参考により本明細書において全て援用される）かつ低い免疫原性を持つものである。とりわけ、55kDa TNF α 細胞表面レセプター（p55TNF-R）と75kDa TNF α 細胞表面レセプター（p75TNF-R）が本発明で有用である。これらレセプターの細胞外ドメイン（ECD）または機能的なその一部を含有する、これらレセプターの短縮型（例えば、Corcoranら、Eur. J. Biochem., 223:831~840（1994）を参照のこと）も本発明で有用である。ECDを含有するTNF α レセプターの短縮型は、30kDaおよび40kDa TNF α 阻害性結合タンパク質として尿と血清中に検出されている（Engelmann, H.ら、J. Biol. Chem., 265:1531~1536（1990））。TNF α レセプター多量体分子とTNF α 免疫レセプター融合分子および

それらの誘導体と断片もしくは一部は、本発明の方法と組成物に有用な TNF α レセプター分子のさらなる例である。本発明で使用できる TNF α レセプター分子は、長期間にわたる患者の治療に使用でき、その間、良好ないし優れた症状の軽減と低い毒性を示すそれらの能力を特徴とする。低い免疫原性および／または高い親和性とその他の不確定な特性が、達成される治療結果に貢献しうる。

本発明で有用な TNF α レセプター多量体分子は、1以上のポリペプチドリンカーまたはポリエチレングリコール（PEG）などの他の非ペプチドリンカーを介して連結された2以上のTNF α レセプターのECDの全体または機能的部分を含有する。該多量体分子はさらに、その多量体分子の発現を方向付けるために、分泌性タンパク質のシグナルペプチドを含みうる。これら多量体分子とそれらの製造方法は、米国特許出願第08/437,533号（1995年5月9日出願）に記載されており、その内容は参考により本明細書において全て援用される。

本発明の方法と組成物で有用な TNF α 免疫レセプター融合分子は、1以上の免疫グロブリン分子の少なくとも一部分と、1以上のTNF α レセプターの全部または機能的一部分とを含有する。これらの免疫レセプター融合分子は単量体として、またはヘテロもしくはホモ多量体として組み立てることができる。また免疫レセプター融合分子は、一価でも多価でもよい。かかる TNF α 免疫レセプター融合分子の例は、TNF α レセプター/IgG融合タンパク質である。

TNF α 免疫レセプター融合分子とそれらの製造方法は当技術分野に記載がある（Lesslauerら, Eur. J. Immunol., 21:2883~2886 (1991); Ashkenaziら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535~10539 (1991); Peppelら, J. Exp. Med. 174:1483~1489 (1991); Kolliasら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:215~219 (1994); Butlerら, Cytokine, 6(6):616~623

(1994); Bakerら, Eur. J. Immunol., 24:2040~2048 (1994); Beutlerら, 米国特許第5,447,851号

；および米国特許出願第08/442, 133号（1995年5月16日出願）
、これらの文献は参照により本明細書において全て援用される）。免疫レセプター融合分子の製造方法は、Caponら、米国特許第5, 116, 964号；Caponら、米国特許第5, 225, 538号；およびCaponら、Nature, 337: 525~531 (1989) にも見出しうる。これらの文献は参考により本明細書において全て援用される。

TNF α レセプター分子の機能的同等物、誘導体、断片または領域とは、TNF α レセプター分子またはTNF α レセプター分子をコードするTNF α レセプター分子配列のうち、本発明で使用できるTNF α レセプター分子に機能的に類似する（例えば高い親和性でTNF α を結合し、低い免疫原性を有する）のに足りるサイズと配列とを持つ部分を指す。TNF α レセプター分子の機能的同等物には、本発明で使用できるTNF α レセプター分子に機能的に類似する（例えば高い親和性でTNF α を結合し、低い免疫原性を有する）修飾TNF α レセプター分子も含まれる。例えば、TNF α レセプター分子の機能的同等物は「サイレント」コドンまたは1以上のアミノ酸置換、欠失もしくは付加（例えば、ひとつの酸性アミノ酸で他のひとつの酸性アミノ酸を置換；もしくは、疎水性アミノ酸をコードするひとつのコドンを、同じまたは異なる疎水性アミノ酸をコードする他のひとつのコドンで置換）を含有しうる。Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience社、ニューヨーク（1989）を参照のこと。

VEGFアンタゴニスト

本明細書でいう、「血管内皮増殖因子アンタゴニスト」は、インビボでVEGF活性合成またはレセプターシグナル伝達を減少、ブロック、阻害、抑止または妨害する。VEGFアンタゴニストには、抗VEGF抗体とその抗原結合性断片；VEGFに特異的に結合するレセプター分子と誘導体；およびVEGFレセプターアンタゴニストが含まれる。VEGFアンタゴニストには、VEGF機能を減少、阻害、ブロック、抑止または妨害する薬剤が含まれ、例えばスラミンやブ

ロテインチロシンキナーゼ (PTK) インヒビター (例えばラベンズチンA (lavendustin A)) などがあるが、これらに限らない。例えば、Waltenbergerら, J. Mol. Cell. Cardiol., 28: 1523~1529 (1996) ; およびHuら, Brit. J. Pharmacol., 114: 262~268 (1995) を参照のこと。VEGFアンタゴニストには、また、VEGFレセプターまたはその細胞外ドメインへのVEGFの結合を減少、阻害、ブロック、抑止または妨害する薬剤が含まれ、例えば血小板因子4 (PF-4) などがあるが、これに限らない。例えば、Gengrinovitchら, J. Biol. Chem., 270: 15059~15065 (1995) を参照のこと。VEGFアンタゴニストには、VEGFレセプターシグナル伝達を減少、阻害、ブロック、抑止または妨害する薬剤と、VEGF活性化を減少、阻害、ブロック、抑止または妨害する薬剤が含まれ、例えばミトライシンなどがあるが、これに限らない。例えば、Ryutoら, J. Biol. Chem., 271 (45) : 28220~28228 (1996) を参照のこと。VEGFアンタゴニストには、VEGFの産生を減少、阻害、ブロック、抑止または妨害する薬剤が含まれ、例えばTGF β またはそのリガンドを阻害、ブロック、抑止または妨害する化合物 (例えば抗体を含む薬物とその他の薬剤) などがある。例えば、Frankら, J. Biol. Chem., 270: 12607~12613 (1995) ; およびPertovaaraら, J. Biol. Chem., 269: 6271~6274 (1994) を参照のこと。さらにVEGFアンタゴニストには、VEGFの産生および/または合成を駆動するシグナルのアンタゴニストである薬剤が含まれる。

抗-VEGF抗体

本明細書でいう、抗-VEGF抗体 (もしくはその抗原結合性断片) は、インビボでVEGF活性を減少、ブロック、阻害、抑止または妨害する。抗体と抗原結合性断片は上述のとおりである。例えば、該抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよい。上述のように、該抗体は単鎖キメラ、ヒト化、靈長類化またはベニヤード抗体であってよい。かかる抗体または断片は上述のように得ること

ができる。抗-VEGF抗体（およびその抗原結合性断片）は、VEGFへの高親和性結合（例えば VEGF_{121} 、 VEGF_{165} 、 VEGF_{189} または VEGF_{206} への高親和性結合）と低い毒性（HAMMAおよび／またはHACA応答を含む）とを特徴とするものが有利である。可変領域、定常領域およびフレームワークなどの個々の成分が個別におよび／または全体として低い免疫原性を有する抗体は、とりわけ有用である。特定の態様として、抗-VEGF抗体（およびその抗原結合性断片）は、それらが長期間にわたる患者の治療に使用でき、その間、良好ないし優れた症状の軽減と低い毒性を示すことを特徴とする。低い免疫原性および／または高い親和性とその他の不確定な特性が、達成される治療結果に貢献しうる。

抗-VEGF抗体（もしくはその抗原結合性断片）の例は当技術分野に記載がある（例えば、Asanoら、Hybridoma, 14(5):475~480(1995)；およびKimら、Growth Factors, 7:53~64(1992)を参照のこと；これらの文献は参考により本明細書において全て援用される）。

VEGFレセプター分子

本発明において有用なVEGFレセプター分子は、特異的にVEGFに結合し、低い免疫原性を有する。好ましくは、VEGFレセプター分子は、VEGFに対する高親和性結合を特徴とする。VEGFレセプター分子には、チロシンキナーゼレセプター、KDR、Flk（例えば、Flk-1）およびFlt（例えば、Flt-1およびFlt-4）等のVEGFレセプターが含まれる（例えば、Leeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:1988~1992(1996)；deVriesら、Science, 255:989~991(1992)；Quinnら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7533~7537(1993)；Shibuyaら、Oncogene, 5:519~524(1990)；およびTerrianら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 187:1579~1586(1992)を参照のこと、これらの文献は、本明細書中で参考により全て援

用される）。VEGFレセプター分子には、また、VEGFレセプター多量体分子およびVEGF免疫レセプター融合分子、ならびにそれらの誘導体および断片もしくは一部が含まれる。

VEGFレセプター多量体分子は、1以上のリンカーを介して連結した2以上のVEGFレセプターの全てもしくは機能性部分を含み得る。VEGFレセプター多量体分子は、さらに、その多量体分子の発現を方向づけるための、分泌性タンパク質のシグナルペプチドを含み得る。

VEGF免疫レセプター融合分子は、1以上の免疫グロブリン分子の少なくとも一部分および1以上のVEGFレセプターの全てもしくは機能性部分を含み得る。VEGF免疫レセプター融合分子は、単量体、またはヘテロ多量体もしくはホモ多量体として組み立て得る。VEGF免疫レセプター融合分子は、また、一価または多価であり得る。VEGF免疫レセプター融合分子の例は、Aieloら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92(23):10457~10461(1995)に記載されており、その教示は、参照により本明細書中で全て援用される。また、Aieloら, N. Engl. J. Med.

, 331:1480~1487(1994);およびParkら, J. Biol. Chem., 269:25646~25654(1994)を参照のこと。その教示は、参照により本明細書中で全て援用される。

VEGFレセプター分子の機能性同等物、誘導体、断片もしくは領域とは、VEGFレセプター分子の一部、または、本発明において用い得る、機能的にVEGFレセプター分子に類似する（例えば、VEGFに特異的に結合し、低い免疫原性を有する）ための充分なサイズおよび配列である、VEGFレセプター分子をコードするVEGFレセプター分子配列の一部を指す。VEGFレセプター分子の機能性同等物は、また、本発明において用い得るVEGFレセプター分子と機能的に類似する（例えば、VEGFに特異的に結合し、低い免疫原性を有する）改変VEGFレセプター分子を含む。例えば、VEGFレセプター分子の機能性同等物には、「サイレント」コドンまたは1以上のアミノ酸置換、欠失もしくは付加を含み得る。例えば、VEGFレセプター分子の機能性同等物は、ひとつ

の酸性アミノ酸の他のひとつの酸性アミノ酸への置換、または、同じもしくは異なる疎水性アミノ酸をコードするひとつのコドンの疎水性アミノ酸をコードする他のひとつのコドンへの置換を含み得る。Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. およびWiley~Interscience, New York (1989) を参照のこと。

TNF α レセプター分子を調製するための本明細書に記載する技術は、本発明に用い得るVEGF レセプター分子を調製する際に用いられ得る。

メトレキサート

現在入手可能な経口用および静脈注射用のメトレキサートの組成物には、ルーマトレックス（登録商標）メトレキサート用量パック（Lederle Laboratories, Wayne, NJ）；メトレキサート錠（Mylan Pharmaceuticals Inc., Morgantown, WV；Roxane Laboratories, Inc., Columbus, OH）；および注射用ナトリウムメトレキサート錠ならびに注射（Immunex Corporation, Seattle, WA）およびナトリウムメトレキサートLPF（登録商標）（ナトリウムメトレキサート注射）（Immunex Corporation, Seattle, WA）が含まれる。メトレキサートは、ファルマコケミエ（オランダ）からも入手可能である。メトレキサートプロドラッグ、ホモログおよび／またはアナログ（例えば、葉酸アンタゴニスト）も、本発明に用い得る。他方、他の免疫抑制剤（もしくは免疫系を抑制する薬物）を本発明に用い得る。

投与

本発明のTNF α アンタゴニスト、VEGF アンタゴニスト、メトレキサートおよび組成物を、種々の方法で個体に投与し得る。投与の経路としては、皮内経路、経皮経路（例えば、徐放性ポリマー中で）、筋内経路、腹膜内経路、静脈内経路（点滴および／またはボーラス注射を含む）、皮下経路、経口経路、局所経路、硬膜外経路、頬面経路、直腸経路、経膣経路および鼻腔内経路が含まれる。

。他の適する投与経路も、例えば、上皮内層または皮膚粘膜内層を通して吸収させるために用い得る。本発明のTNF α アンタゴニスト、VEGFアンタゴニスト、および組成物を、遺伝子治療よっても投与し得る。該遺伝子治療では、特定の治療的タンパク質もしくはペプチドをコードするDNA分子を、例えば、特定のタンパク質もしくはペプチドをインビボで発現させ、治療的レベルで分泌させるベクターを介して、患者に投与する。また、本発明のTNF α アンタゴニスト、VEGFアンタゴニスト、メトレキサートおよび組成物を、製薬学上許容し得る界面活性剤（例えば、グリセリド）、賦形剤（例えば、ラクトース）、担体、希釈剤および媒体等の他の生物学的に活性な薬剤成分と共に投与し得る。所望

により、特定の甘味剤、着香剤および／または着色剤も添加し得る。

本発明のTNF α アンタゴニスト、VEGFアンタゴニスト、メトレキサートおよび組成物を、予防的にもしくは治療的に個体に投与し得る。TNF α アンタゴニストを、VEGFアンタゴニストの投与の前に、その投与と同時に（同じ組成物もしくは異なる組成物中で）またはその投与に続けて投与し得る。TNFアンタゴニストおよびVEGFアンタゴニストを、また、メトレキサートの投与の前に、その投与と同時に（同じ組成物もしくは異なる組成物中で）またはその投与に続けて投与し得る。例えば、TNFアンタゴニストおよびVEGFアンタゴニストを、メトレキサート治療に対する付加治療および／または同時治療として投与し得る。

非経口（例えば、静脈内、皮下、筋内）投与では、本発明のTNF α アンタゴニスト、VEGFアンタゴニスト、メトレキサートおよび組成物を、製薬学上許容し得る非経口媒体と共に、溶液、懸濁液、エマルジョンもしくは凍結乾燥粉末として処方し得る。かかる媒体の例示は、水、生理的食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび固定油等の非水系媒体も用い得る。媒体または凍結乾燥粉末は、等張性（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性（例えば、緩衝液および保存剤）を維持する添加物を含み得る。該組成物は、通常用いられる技術で殺菌される。

適する医薬用担体は、Gennaro, A. R. 編, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990) に記載されている。

例えば、注射による投与に適する非経口組成物は、0.9%塩化ナトリウム溶液中に活性な成分を1.5重量%溶解することにより調製される。

TNF α アンタゴニスト、VEGFアンタゴニストおよびメトトレキサートは

、治療上の有効量でもしくは共同作用的な量で投与される；本発明の組成物は、治療上の有効量でもしくは共同作用的な量で投与される。本明細書中で用いられている、治療上の有効量とは、TNF α アンタゴニストおよびVEGFアンタゴニストの治療上の有効量が同時に投与されない場合のTNF α およびVEGFの生物学的活性と比較して、または組成物の治療上の有効量が投与されない場合のTNF α およびVEGFの生物学的活性と比較して、TNF α アンタゴニストおよびVEGFアンタゴニストの同時投与、または本発明の組成物の投与によりTNF α およびVEGFの生物学的活性が阻害される量である。治療上の有効量とは、また、TNF α アンタゴニスト、VEGFアンタゴニストおよびメトトレキサートの同時投与により、TNF α アンタゴニスト、VEGFアンタゴニストおよびメトトレキサートの治療上の有効量が同時に投与されない場合のTNF α およびVEGFの生物学的活性と比較して、TNF α およびVEGFの生物学的活性が阻害される量である。治療上の有効量とは、特定のTNF媒介疾患に関連する症状を共同作用的にもしくは有意に低減もしくは除去するために必要なTNF α アンタゴニストおよびVEGFアンタゴニストの量である。治療上の有効量とは、また、特定のTNF媒介疾患に関連する症状を共同作用的にもしくは有意に低減もしくは除去するために必要なTNF α アンタゴニスト、VEGFアンタゴニストおよびメトトレキサートの量である。本明細書中で用いられている、治療上の有効量は、TNF α アンタゴニスト単独の投与、VEGFアンタゴニスト単独の投与、またはメトトレキサート単独の投与により、TNF α もしくはVEGFの生物学的活性が必ず阻害されなければならないという量ではない。

いったん治療上の有効量もしくは共同作用的な量を投与すれば、TNF α アンタゴニスト単独の維持量、VEGFアンタゴニスト単独の維持量、メトトレキサート単独の維持量、またはその組み合わせの維持量を個体に投与し得る。維持量とは、治療上の有効投与量によりなされた症状の低減もしくは除去を維持するために必要なTNF α アンタゴニストの量、VEGFアンタゴニストの量、メトトレキサートの量、またはその組み合わせの量である。維持量は、単回投与、または一連の投与または日もしくは週ごとに分けられた投与の形で投与され得る。

個体に投与される用量は、特定の治療的薬剤の薬力学的特性、ならびにその様式および投与経路；レシピエントのサイズ、年齢、健康、性別、体重および食事；治療される疾患の症状の性質および程度、同時治療の種類、治療の頻度、ならびに所望の効果を含む種々の因子に依存して変化するであろう。インビトロおよびインビボでのTNF α の阻害を測定する方法は、当業者によく知られている。かかるインビトロでのアッセイは、TNF細胞毒性アッセイ（例えば、WEHIアッセイもしくはラジオイムノアッセイ、ELISA）を含み得る。インビボでの方法は、げっ歯動物死亡率アッセイ、靈長類病理学モデル系（例えば、Mathisonら, J. Clin. Invest., 81:1925~1937 (1988) ; Beutlerら, Science 229:869~871 (1985) ; Traceyら, Nature, 330:662~664 (1987) ; Shimamotoら, Immunol. Lett., 17:311~318 (1988) ; Silvaら, J. Infect. Dis., 162:421~427 (1990) ; Opalら, J. Infect. Dis., 161:1148~1152 (1990) : およびHinshawら, Circ. Shock, 30:279~292 (1990) ）および／または関節炎のげっ歯動物モデル（Williamsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:9784~9788 (1992) ）を含み得る。リュウマチ性関節炎を有する患者において、TNF α のブロック（blockade）は、IL-6およびC-反応性タンパク質レベルを監視することにより監視し得る（Elliotら, Arth. Rheum., 36:1681~1690 (1993) ）。V

E G F 阻害の測定法は、また、当業者によく知られている（例えば、E L I S A）。

T N F α アンタゴニスト、V E G F アンタゴニストおよびメトトレキサートを

、症状の性質および程度、同時治療の種類および所望の効果等の因子に依存して、単回もしくは複数回の用量で投与し得る。このように、他の治療的養生法または薬剤（例えば、複数薬物養生法）を、T N F α アンタゴニスト、V E G F アンタゴニストおよびメトトレキサートの治療的投与と組み合わせて用い得る。確立された投与量範囲の調節および操作は、当業者の能力内に充分存在する。

通常、活性な成分の1日の用量は、体重1 k g 当たり約0. 01～100 m g であり得る。普通、1日1～6回の分割投与でもしくは放出が維持される形態で、1日に1 k g 当たり1～40 m g が、所望の結果を得るのに効果的である。第2回目の投与または続く投与では、個体に対し投与された初期もしくは以前の用量と同じか、少ないもしくは多い用量で投与し得る。

第2回目の投与または続く投与は、疾患もしくは疾患の症状が再発もしくは再燃する間またはその直前が好ましい。例えば、第2回目の投与および続く投与は、以前の投与から約1日～30週の間に与え得る。必要に応じて、2回投与、3回投与、4回投与もしくはよりトータルな投与量を個体にとらせ得る。

内部投与に適する投薬形態（組成物）は、一般に、単位当たり活性な成分を約0. 1 m g～約500 m g 含有する。これら医薬組成物において、普通、活性な成分は、組成物全量に対し約0. 5～95重量%の量で存在するであろう。

ここで、本発明を以下の実施例により示すが、本発明は、いかようにも、限定されることを意図するものではない。

実施例

実施例1 抗-T N F α 抗体を用いたR A 患者の治療

方法

患者

進行中のリューマチ性関節炎（R A）を有する73人の患者を、抗-T N F α 抗体の多中心無作為化プラセボコントロール二重盲検臨床試験に登録した。全患

者は、ジ アメリカン カレッジ オブ ルーマトロジー (the American College of Rheumatology) の基準に適合した (≥ 6 カ月の間の進行中の RA、少なくとも 1 つの疾患緩和薬物による治療に失敗および手足の X 線撮影で糜爛性疾患の証拠) (Arnett, Arth. Rheum., 31: 315~324 (1988))。また、全患者は、以前に平均 3 つの疾患緩和薬物の投与を受けたことがあり、試験への無作為化および登録の少なくとも 4 週間前にその治療を停止した (Elliot, Lancet: 1105~1110 (1994))。進行中の疾患を、6 以上の肥大した関節の存在および 4 つの二次的基準 (朝の硬直の持続 ≥ 45 分; ≥ 6 の脆いもしくは痛い関節; 赤血球沈降速度 (ESR) ≥ 28 mm/h; C-反応性タンパク質 (CRP) ≥ 20 mg/l (Elliot M. J., Lancet, 344: 1105~1110 (1994)) の内の少なくとも 3 つにより定義した。

試験点滴

キメラモノクローナル抗-TNF α 抗体 cA2 を、1 ml の 0.01% ポリソルベート 80 添加 0.15M 塩化ナトリウムの 0.01M リン酸一緩衝化生理的食塩水、pH 7.2 (Centocor, Inc., Malvern, PA) 当たり 5 mg の cA2 を含有する滅菌溶液として供給した。プラセボ用バイアルでは、同じ緩衝液に 0.1% ヒト血清アルブミンを含有させた。使用前に、cA2 またはプラセボの適当量を、薬剤師により滅菌生理的食塩水中で 300 ml に希釈させ、2 時間かけて 0.2 μ m 直列型フィルターを介して静脈内に投与した。プラセボおよび cA2 点滴袋の特性は同一であり、かつ研究者および患者は、いずれの点滴が投与されているか不知であった。

治療プロトコルおよび血清検体

患者を、プラセボ、1 mg/kg の抗-TNF α モノクローナル抗体 cA2 ま

たは 10 mg/kg の抗-TNF α モノクローナル抗体 cA2 の単回点滴に対し無作為化した。血清検体を 73 人の患者中 69 人から入手した。プラセボ (n = 24) または 1 mg/kg (n = 24) もしくは 10 mg/kg (n = 21) での cA2 の投与前または投与後 4 週間までの血清検体を採取し、53 人の健常者

と比較した。

細胞の調製

全関節置換を受けたRA患者から得た滑膜検体を、 $5\text{ mg}/\text{ml}$ のIV型コラゲナーゼ (Sigma, UK) および $150\mu\text{g}/\text{ml}$ のI型DNアーゼ (Sigma, UK) で消化した (Brennan F. M. ら, Lancet 2: 244~247 (1989))。組織を、 $200\mu\text{l}$ のナイロンメッシュを通してピペットで取り、単独もしくは $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のIL-1レセプターアンタゴニスト (IL-1ra; A. Bergner博士、Upjohn研究所, MI提供)と共に、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗-TNF α モノクローナル抗体cA2の存在下もしくは非存在下で、5%ウシ胎児血清 (FCS; BioWhittaker, Belgium) 添加 RPMI 中、 60 mm^2 のウェルにて細胞を培養した。線維芽細胞のコンフルエントな单層が得られるまで滑膜細胞を継続的に培養して、滑膜線維芽細胞を選抜した。接着細胞を、0.05%トリプシン/ 0.02% EDTAを用いて、さらに継代し、RPMIおよび10%FCS中で培養した。ヒト皮膚微小血管内皮細胞系HMEC-1は、疾患の制御および予防センター (Centre for Disease Control and Prevention) (Atlanta, GA) からの提供であり、ヒト単球細胞系THP-1は、米国組織培養物所蔵所 (American Tissue Culture Collection) (Rockville, MD) からの提供であった。接着細胞 (内皮細胞および線維芽細胞) を、 200 mm^2 のウェルにて、コンフルエントな密度で培養した。THP-1細胞を、 $0.5 \times 10^6 / 60\text{ mm}^2$

ウェルの密度で懸濁した。TNF α (W. Stęc教授, 分子および巨大分子研究センター (Centre of Molecular and Macromolecular Studies), Lodz, Polandから提供) またはIL-1 α (ホフマン ラ ロシュ, USAから提供) の存在下または非存在下において、5%FCS添加RPMI中で72時間、細胞を刺激した。

VEGF アッセイおよび統計分析

培養上清中のVEGFならびに血清検体を、固相酵素免疫測定法 (ELISA

) (R & Dシステムズ, UK) により検定した。入力変数として個人データを用い、群内での比較をウイルコクソンサイン順位検定により患者データを解析し、また、応答変数として0週からの変化%を用い、治療群間での比較をマンホワイトニー (Mann-Whitney) U検定により患者データを解析した。治療群間でのRA滑膜細胞によるVEGF放出の差を、マンホワイトニーU検定により評価した。多数群間での比較を、ボンフェロニ (Bonferroni) 修正を用いて調節した。

ESRおよびCRP評価

ESRを、標準法 (Westergren) により測定した。CRPレベルを、等級 (rate) 比濁計 (アボット蛍光偏光免疫アッセイ) により測定した。また、Elliottら, Lancet 344:1105~1110 (1994) ; Elliottら, Lancet 344:1125~1127 (1994) ; およびElliottら, Arthritis Rheum. 36 (12) : 1681~1690 (1993) を参照のこと。それらの引用文献は、参照により本明細書中で全て援用される。

結果

血清VEGFレベルは、RA患者で増加した：抗-TNF α 抗体による治療の効果

合計で、年齢および性別がそろった非関節炎の53人のヒトならびに進行中のRAを有する69人の患者において、血清VEGF濃度をELISAにより測定した。CRPとVEGFとの間の相関の程度を評価するため、非媒介変数データについてケンダル (Kendall) 順位相関係数を計算した。

53人の非関節炎のヒトのメジアン血清VEGFレベルは、160 pg/m1 (四分位数間領域122~266 pg/m1) に等しかった。対照的に、進行中のRAを有する69人の患者の血清VEGF濃度は、著しく増加し (メジアン503 pg/m1、領域307~887 pg/m1、非RAに対し $p < 0.001$; 図2A) 、循環しているCRP値と相関したが (ケンダル順位相関係数0.252, $p < 0.01$; 図2B) 、肥大した関節または早朝の硬直の数等の疾患の

個人の臨床媒介変数とは相関しなかった。

抗-TNF α によるRA患者の治療により、有意に血清VEGFが減少した（図3）。値は、各治療群についてのメジアンの変化%の計算前の、各患者に対する点滴前からの変化として表した。群内の比較についてウイルコクソンサイン順位検定を用いてデータを解析し (* p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.001)、また、治療群間の比較についてマンホワイトニーU検定によりデータを解析した (+ p ≤ 0.05, ++ p ≤ 0.001)。多数群間の比較についての有意な値を、ボンフェロニ修正を用いて調節した。

1mg/kgのcA2の投与を受けた患者において、VEGF濃度における最も初期の変化は、点滴後1週間で観察され、減少は2週目に最高に達し（30%、点滴前に対しおよびプラセボにおける変化に対し p < 0.001）、その後、血清VEGF濃度は、治療前の値に戻った。10mg/kgのcA2の投与を受けた患者において、血清VEGF濃度における変化は、3週目に最高に達し（42%低下、点滴前に対しおよびプラセボにおける変化に対し p < 0.001）、

抗-TNF α 投与の4週後においてさえ、血清VEGF濃度は、有意に点滴前の値以下であった（図3）。

滑膜細胞によるVEGF分泌は、前炎症性サイトカインに依存する。

RAにおけるVEGF発現が、TNF α およびIL-1に直接依存しているかどうかを決定するため、解離したRA滑膜細胞 (1×10^6 細胞/m²；RA関節由来) を、サイトカイン生物活性の阻害剤（単独または10μg/m²のIL-1raと共に、10μg/m²のcA2）の存在下もしくは非存在下に、2日間培養した。培養上清中のVEGF濃度を、ELISAにより測定した。サイトカイン阻害剤の非存在下におけるVEGF放出に対する統計分析を、マンホワイトニーU一検定により実施した。結果を表1に示した。表の値は、ng/m² VEGFであり、1実験当たり1～6回の測定による、5～6回の実験の典型例である。

表1

添加	メジアン	四分位数間領域	有意性
なし	3. 29	2. 03～6. 96	
抗-TNF α	2. 56	1. 47～6. 46	NS
なし	3. 95	1. 48～7. 98	
抗-TNF α + IL-1 RA	1. 91	0. 74～3. 97	p < 0. 05

合計29/32の実験で、単離後約12時間の培養上清において検出された免疫反応性タンパク質により、滑膜細胞が自発的にVEGFを放出することを見出した。10 μ g/m1の抗-TNF α 抗体cA2存在下において、培養の2日目におけるメジアンのVEGFの放出は、メジアン値で3. 29ng/m1から2. 56ng/m1へと、22%低下した(6回の実験の平均)が、この減少は、統計的に有意ではなかった(表参照のこと)。しかしながら、第2回目の一揃い

の実験では、cA2(10 μ g/m1)およびIL-1ra(10 μ g/m1)の組み合わせの添加により、3. 95ng/m1から1. 91ng/m1へと、VEGFの産生が著しく減少した(5回の実験の平均；阻害52%、未処理細胞からの放出に対し $p < 0. 05$ ；表参照のこと)。同様に、播種の5日後、VEGF放出は、cA2およびIL-1raにより、13. 3ng/m1から9. 5ng/m1へと減少した(平均阻害29%、未処理細胞からの放出に対し $p < 0. 01$ ；2回の実験の平均)。

TNF α は、単球および内皮細胞からのVEGF放出を誘発するが、滑膜線維芽細胞からは誘発しない。

RA関節においてVEGFを発現することができるとして知られている細胞(Kochら, J. Immunol., 152:4149～4156(1994)：およびFavaら, J. Exp. Med., 180:341～346(1994))からのVEGF産生のサイトカイン依存性についても、調査した。単球細胞(THP-1)、ヒト微小血管内皮細胞(HMEC-1)およびヒトRA滑膜線維芽細胞を、10ng/m1のTNF α またはIL-1 α の存在下または非存

在下において、72時間インキュベートした。上清中へのVEGF放出を、ELISAにより測定した。

RA滑膜線維芽細胞および単球THP-1は、自発的にVEGFを放出した（図1）。また、微小血管内皮細胞も、本質的に多量のVEGFタンパク質を放出することを見出した（図1）。しかしながら、THP-1単球細胞からのVEGF分泌は、TNF α により著しく増加し（2.61倍増加）、IL-1 α によっては増加しなかったが、TNF α に対するRA滑膜線維芽細胞の応答は、IL-1 α により誘発されるより（2.23倍増加；図1）低かった（1.29倍増加）。対照的に、内皮細胞は、TNF α およびIL-1 α に対しほとんど等しい応答性であった（それぞれ3.37倍および3.22倍増加；図1）。これらのデータは、RA関節に存在する細胞の代表例である細胞型からのVEGF放出は、前炎症性サイトカインにより誘発され得ること、および、TNF α およびIL-1は、異なる細胞亜型からのVEGF放出を区別して調節するということを示唆する。

実施例2 抗-TNF α 抗体をメトトレキサートと組み合わせて使用することによるRA患者の治療

方法

患者

少なくとも6ヶ月間メトトレキサートを使用しており、7.5mg/週のメトトレキサートの安定的な投与を4週間行われてきた、43人の進行中のRA患者を、メトトレキサート治療に付随した抗-TNF α 抗体の、多中心無作為化プラセボ制御二重盲検臨床試験に登録した。すべての患者はジ アメリカン カレッジ オブ ルーマトロジーの基準（≥6ヶ月の間の進行中のRA、少なくとも1つの疾患緩和薬物による治療に失敗および手足のX線撮影上に糜爛性疾患の証拠（Arnettら, Arth. Rheum.、31:315~324 (1988)）に適合していた。6つ以上の肥大した関節に加えて、4つの二次的基準（朝の硬直の持続≥45分；≥6の脆いもしくは痛い関節：赤血球沈降速度（ESR）≥28mm/h；C-反応性タンパク質（CRP）≥20mg/l（Elliott）

ott M. J. ら、Lancet, 344: 1105~1110 (1994) のうちの少なくとも3つが見られることにより、進行中の疾患であると定義した。

試験点滴

キメラモノクローナル抗-TNF α 抗体cA2を、1mlの0.01%ポリソルベート80を添加した0.15M塩化ナトリウムの0.01Mリン酸-緩衝化生理的食塩水、pH7.2 (Centocor, Inc., Malvern, P

A) 当たり5mgのcA2を含有する滅菌溶液として供給した。プラセボ用バイアルでは、同じ緩衝液に0.1%ヒト血清アルブミンを含有させた。使用前に、cA2またはプラセボの適当量を、薬剤師により滅菌生理的食塩水中で300mlに希釈させ、2時間かけて0.2μm直列型フィルターを介して静脈内に投与した。プラセボおよびcA2点滴袋の特性は同一であり、かつ研究者および患者は、いずれの点滴が投与されているか不知であった。

治療プロトコル及び血清検体

患者は七つの治療群の一つに無作為化された。各投与（又は治療）群における患者数を表2に示す。43人の各患者に対して、0、1、3又は10mg/kgのcA2のいずれかの複合的な点滴を行った。点滴は、0、2、6、10及び14週目とした。0週目の開始時において、患者は7.5mg/週のメトトレキサート（ファルマコケミエ、オランダ）、又はプラセボタブレット3錠/週（ファルマコケミエ、オランダ）を受けていた。面接、身体検査及び研究所での試験により、点滴期間を通して、及びその後も規則的に患者の副作用について監視した。初期点滴の前及び初期点滴後28週目までの血清検体を得た。

VEGFアッセイ、ESR及びCRP評価、並びに統計的解析を、実施例1に記載のようになった。

表2

c A 2 (mg/kg)	MTX (7.5 mg/週)	評価した患者
0	+	5
1	+	6 7
3	+	6 6
10	+	7 6

結果

c A 2 およびメトトレキサートの組み合わせによる R A 患者の治療により、 c A 2 単独またはメトトレキサート単独のいずれかを受けた患者と比較して血清 V E G F レベルの低下がより長期化した（図 4 A および図 4 B）。たとえば、 3 mg/kg の c A 2 単独の点滴では循環 V E G F レベルが顕著に低下したもの、これらの値は最終点滴後には点滴前の濃度に戻った（20 週目の血清 V E G F レベルは点滴前の 87 % に等しかった。）。対照的に、メトトレキサートと一緒に c A 2 を与えられた患者では、循環 V E G F レベルの低下は c A 2 の最終点滴後 6 週間でさえ続いた（20 週目の血清 V E G F レベルは点滴前の 56 % に等しかった。図 4 A）。この効果は c A 2 の投与量に依存していた。即ち、 1 mg/kg の c A 2 をメトトレキサートと組み合わせて与えられた患者よりも、 3 又は 10 mg/kg の c A 2 をメトトレキサートと組み合わせて与えられた患者の方が、 血清 V E G F レベルの低下がより長く維持されていた（図 4 B）。

要約

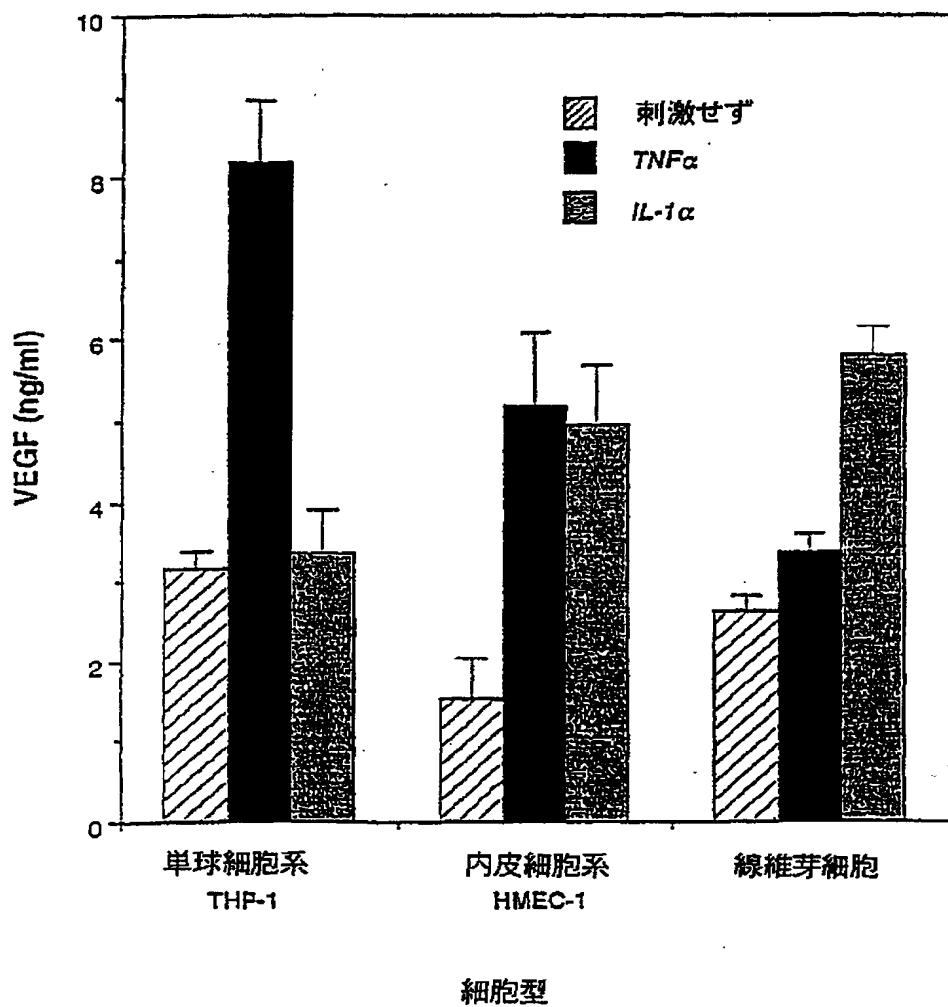
実施例 1 及び 2 の結果は、 T N F α や I L - 1 等の前炎症性サイトカインは、 R A の発病の間、血管形成や V E G F の主な媒介物を調節すること、及びサイトカイン活性のブロックは新血管形成を調節することを示している。特に、抗-T N F α 抗体による治療後の血清濃度の低下から判断されるように、 T N F α は、インビボでの V E G F の産生を調節し、このことは、抗-T N F α 抗体による治療の利点の一部は血管形成の減少によるかもしれないこと、長期間の T N F α の

ブロックは新血管形成を低減できる、それによりパナスの細胞量及びその破壊能力を低減できることを示唆する。VEGFは、RAにおいて抗-TNF α 治療との相乗作用を達成するための適切な治療標的であり、長期間の利益に結びつく。
均等物

当業者であれば、単なる日常的な実験手法により、本明細書に記載の発明の特定の態様についての多くの均等物を認識し、又は確認することができるであろう。かかる均等物は、以下の請求の範囲に包含されるものである。

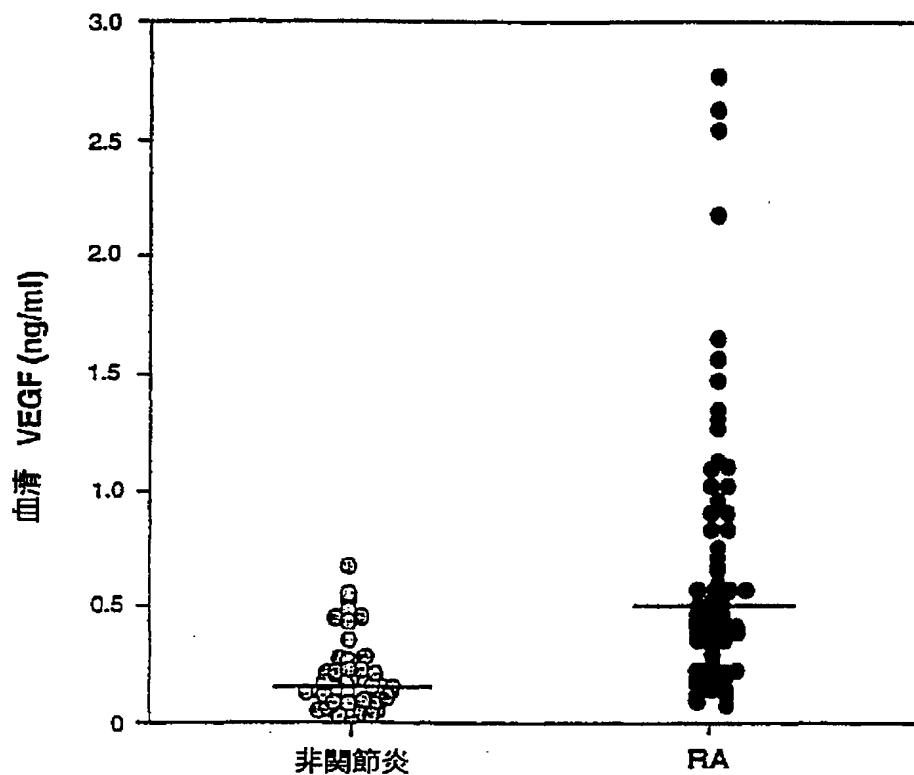
【図1】

Figure 1



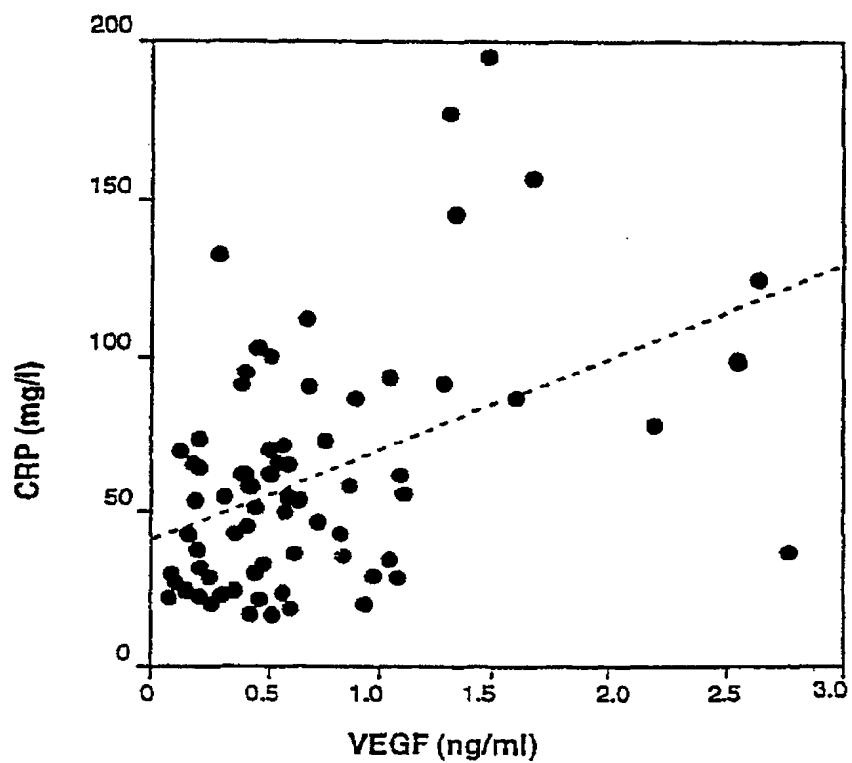
【図2】

Figure 2 A



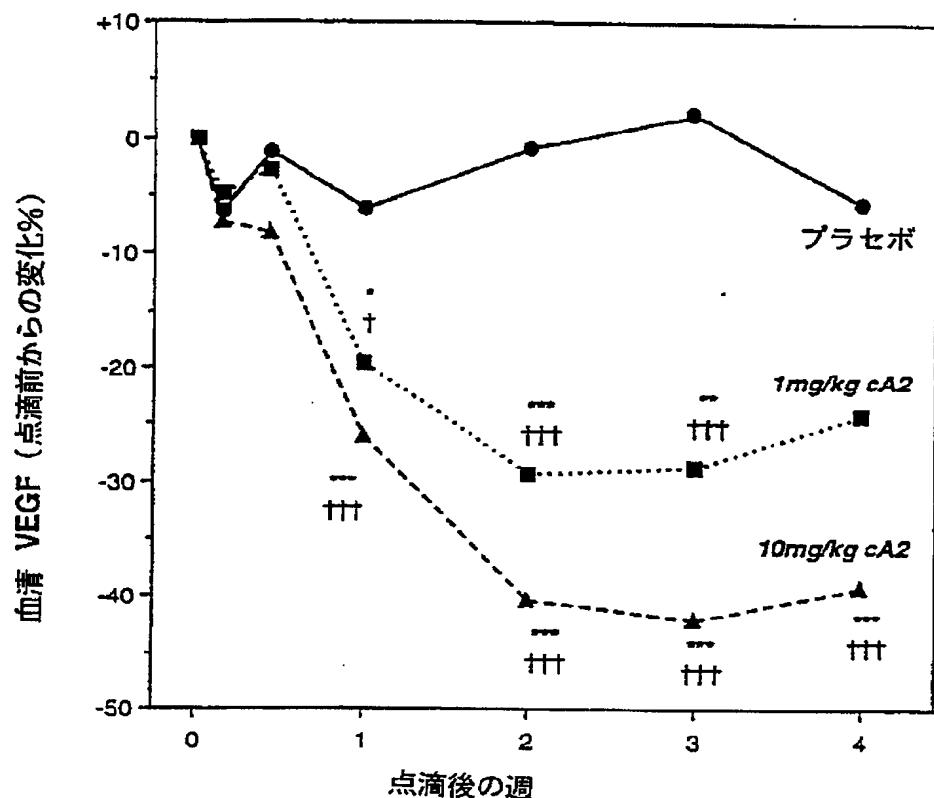
【図2】

Figure 2 B



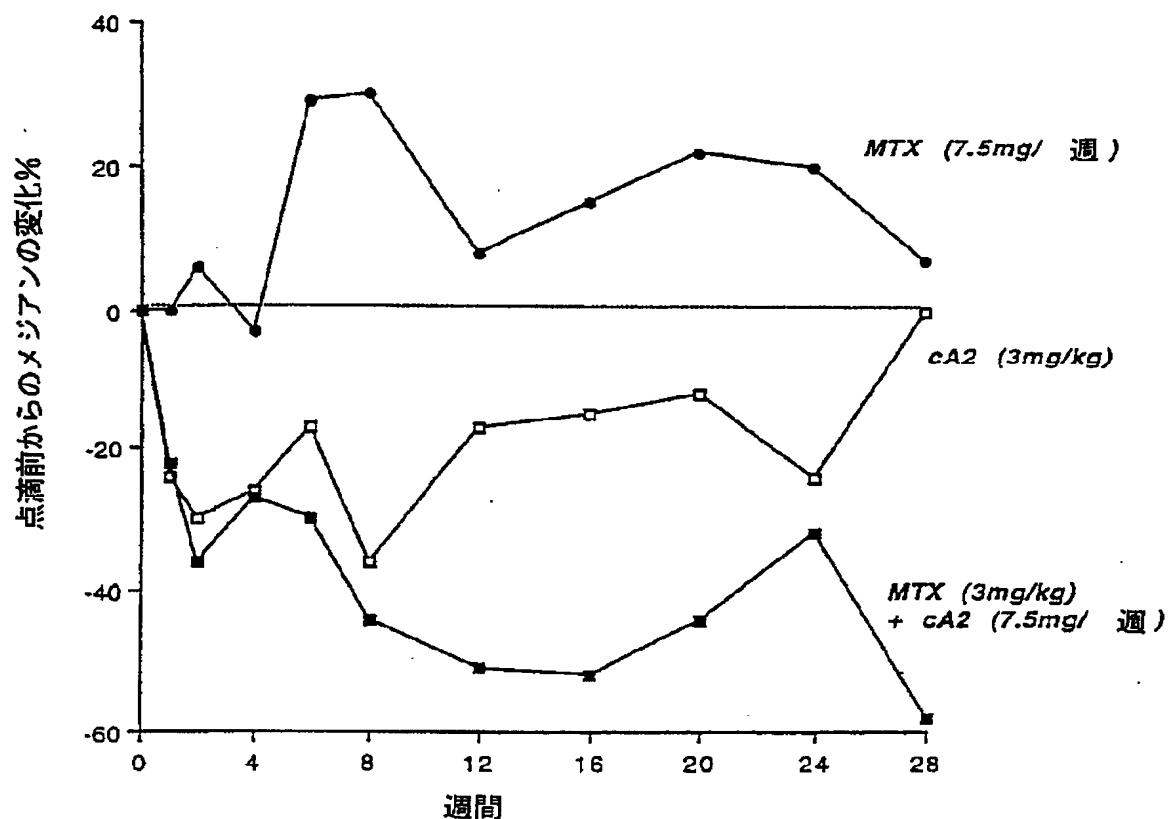
【図3】

Figure 3



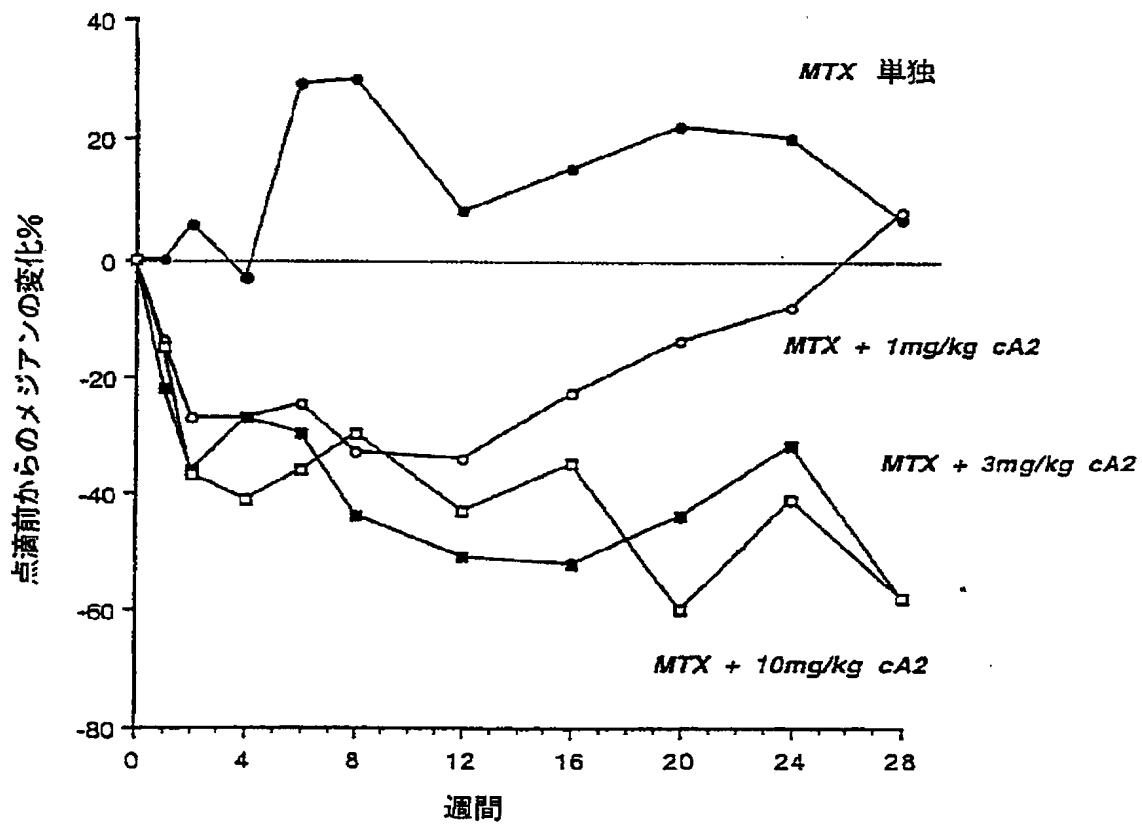
【図4】

Figure 4 A



【図4】

Figure 4 B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 98/01343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 6 A61K39/395 A61K31/00 A61K31/505 A61K38/17 //A61K31:505		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FELDMANN, MARC: "What is the mechanism of action of anti-tumor necrosis factor-.alpha. antibody in rheumatoid arthritis?" INT. ARCH. ALLERGY IMMUNOL. (DECEMBER 1996), 111(4), 362-365 CODEN: IAAIEG;ISSN: 1618-2438, XP002071536 see the whole document ---	1-8, 14-21, 35-42, 45 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
<ul style="list-style-type: none"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 		
<ul style="list-style-type: none"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "G" document member of the same patent family 		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
15 July 1998	22.09.98	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5816 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epant Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mennessier, T	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Jpn. Application No.
PCT/GB 98/01343

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAVANAUGH A F ET AL: "Anti- TNF - alpha monoclonal antibody (mAb) treatment of rheumatoid arthritis (RA) patients with active disease on methotrexate (MTX); results of a double-blind, placebo controlled multicenter trial." 60TH NATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY AND THE 31ST NATIONAL SCIENTIFIC MEETING OF THE ASSOCIATION OF RHEUMATOLOGY HEALTH PROFESSIONALS, ORLANDO, FLORIDA, USA, OCTOBER 18-22, 1996. ARTHRITIS & RHEUMATISM 39 (9 SUPPL), XP002048557 Abstract No. 575 see the whole document ---	3,17,23, 30,35, 40-43
P,Y	FELDMANN, MARC ET AL: "Anti-tumor necrosis factor alpha therapy of rheumatoid arthritis. Mechanism of action" EUR. CYTOKINE NETWORK (SEPTEMBER 1997), 8(3), 297-300 CODEN: ECYNEJ;ISSN: 1148-5493, XP002071537 see page 298, right-hand column ---	1-46
P,Y	VAN DEVENTER S J H: "Immunomodulation of Crohn's disease using TNF - alpha neutralizing monoclonal antibodies." CLINICAL NUTRITION (EDINBURGH) 16 (6). DECEMBER 1997. 271-275. ISSN: 0261-5614, XP002071538 see the whole document ---	22-27
Y	WO 92 16553 A (UNIV NEW YORK ;CENTOCOR INC (US)) 1 October 1992 see the whole document ---	1-8, 14-46
Y	WO 94 10202 A (GENENTECH INC) 11 May 1994 see the whole document ---	1-46
Y	WO 94 06476 A (IMMUNEX CORP) 31 March 1994 see the whole document ---	9,10
P,Y	WO 97 30088 A (KENNEDY INST OF RHEUMATOLOGY) 21 August 1997 see the whole document ---	1-46
P,Y	WO 98 05357 A (MAINI RAVINDER NATH ;FELDMANN MARC (GB); KENNEDY INST OF RHEUMATOL) 12 February 1998 see the whole document -----	3,17,23, 30,35, 40-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int'l. Jpnal Application No
PCT/GB 98/01343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9216553	A 01-10-1992	AU	668864 B	23-05-1996
		AU	1764992 A	21-10-1992
		CA	2106299 A	19-09-1992
		EP	0610201 A	17-08-1994
		JP	6506120 T	14-07-1994
		US	5656272 A	12-08-1997
		US	5698195 A	16-12-1997
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9410202	A 11-05-1994	AU	687727 B	05-03-1998
		AU	2928992 A	24-05-1994
		BG	99605 A	29-02-1996
		BR	9207175 A	12-12-1995
		EP	0666868 A	16-08-1995
		FI	951987 A	26-04-1995
		JP	8502514 T	19-03-1996
		NO	951609 A	27-04-1995
		SK	55195 A	09-08-1995
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9406476	A 31-03-1994	AU	670125 B	04-07-1996
		AU	4920993 A	12-04-1994
		CA	2123593 A	31-03-1994
		EP	0620739 A	26-10-1994
		JP	7504203 T	11-05-1995
		NO	941780 A	15-07-1994
		NZ	256293 A	24-06-1997
		US	5605690 A	25-02-1997
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9730088	A 21-08-1997	NONE		-----
-----	-----	-----	-----	-----
WO 9805357	A 12-02-1998	AU	3703597 A	25-02-1998
-----	-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷ 識別記号 F I テーマコード(参考)
 A 6 1 P 29/00 1 0 1 A 6 1 P 37/02
 37/02 43/00 43/00 1 1 1
 43/00 1 1 1
 1 1 1 A 6 1 K 37/02

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
 DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
 T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ
 , CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR,
 NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, L
 S, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ
 , BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL
 , AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
 BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, E
 E, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU
 , ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
 KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, M
 D, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL
 , PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
 SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, V
 N, YU, ZW

(72) 発明者 パレオログ, エバ, マリア
 英国, ロンドン ダブリュー5 3ジェイ
 アール イーリング, デラメア ロード
 36

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成17年12月2日(2005.12.2)

【公表番号】特表2001-525816(P2001-525816A)

【公表日】平成13年12月11日(2001.12.11)

【出願番号】特願平10-548911

【国際特許分類第7版】

A 6 1 K 45/06

A 6 1 K 31/454

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 39/395

A 6 1 P 29/00

A 6 1 P 37/02

A 6 1 P 43/00

【F I】

A 6 1 K 45/06

A 6 1 K 31/454

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 29/00 1 0 1

A 6 1 P 37/02

A 6 1 P 43/00

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 K 37/02

【手続補正書】

【提出日】平成17年5月10日(2005.5.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

手 続 補 正 書

平成17年5月10日



特許庁長官 殿

1. 事件の表示

平成10年特許願第548911号

2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 英国、ロンドン ダブリュー6 8エルエイチ,
ハマースミス、ワン アスペンリー ロード
(番地なし)

名 称 ザ ケネディー インスティチュート オブ
リューマトロジー

3. 代理人

居 所 〒540-6591 大阪市中央区大手前1丁目7番31号
○MMビル5階 秘書箱26号 細田国際特許事務所
TEL 06(6910)6733

氏 名 (9583) 弁理士 細田 芳徳



4. 補正対象書類名

(1) 明細書

5. 補正対象項目名

(1) 特許請求の範囲

6. 補正の内容

(1) 別紙のとおり、特許請求の範囲を訂正する。

以上



[別紙]

請求の範囲

1. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストを含有してなる組成物。
2. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項1記載の組成物。
3. 抗体が、キメラ抗体である請求項2記載の組成物。
4. 血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項1記載の組成物。
5. 腫瘍壞死因子アルファアンタゴニストが、抗一腫瘍壞死因子アルファ抗体もしくはその抗原結合性断片であり、かつ血管内皮成長因子アンタゴニストが、抗一血管内皮成長因子抗体もしくはその抗原結合性断片である、請求項1記載の組成物。
6. さらに、メトレキサートを含有してなる請求項1記載の組成物。
7. 自己免疫疾患、急性もしくは慢性の免疫疾患、炎症性疾患および神経変性疾患等の腫瘍壞死因子媒介疾患を治療または予防するための、請求項1～6のいずれか記載の組成物。
8. リューマチ性関節炎を治療または予防するための、請求項1～6のいずれ

か記載の組成物。

9. 移植に関連する急性もしくは慢性の免疫疾患を治療または予防するための、請求項1～6のいずれか記載の組成物。

10. 自己免疫疾患、急性もしくは慢性の免疫疾患、炎症性疾患および神経変性疾患等の腫瘍壊死因子媒介疾患を治療または予防するための組成物の製造のための、腫瘍壊死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストの使用。

11. リューマチ性関節炎を治療または予防するための組成物の製造のための、腫瘍壊死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストの使用。

12. 移植に関連する急性もしくは慢性の免疫疾患を治療または予防するための組成物の製造のための、腫瘍壊死因子アルファアンタゴニストおよび血管内皮成長因子アンタゴニストの使用。